

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI

**Tesi di Laurea Magistrale in
Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali**

**UN TRATTAMENTO COMBINATO DI ULTRASUONI E ANIDRIDE
CARBONICA IN PRESSIONE PER LA PASTORIZZAZIONE DI
ALIMENTI SOLIDI: STUDIO SPERIMENTALE DI FATTIBILITÀ**

Relatore: Prof. Alberto Bertucco

Correlatore: Prof. Ing. Sara Spilimbergo

Ing. Giovanna Ferrentino

Laureando: NICOLA CALLIARI

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

Riassunto

Il lavoro svolto in questa tesi ha lo scopo di mettere a punto un sistema di pastorizzazione di matrici solide alimentari, accoppiando al trattamento con CO₂ in pressione gli ultrasuoni e, di verificare inoltre l'efficacia del trattamento sulla flora naturale di cocco e carota e su *Salmonella enterica*, microrganismo che è noto per la sua resistenza al trattamento con CO₂, misurando le cinetiche di disattivazione.

I dati ottenuti sono correlati utilizzando il modello di Weibull.

Indice

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1 – Pastorizzazione con CO₂ supercritica e ultrasuoni	3
1.1 PASTORIZZAZIONE CON CO ₂ SUPERCRITICA: STATO DELL'ARTE	3
1.2.1 Meccanismo di disattivazione microbica	5
1.2 PASTORIZZAZIONE CON ULTRASUONI: STATO DELL'ARTE	7
1.2.1 Meccanismo di disattivazione microbica	10
1.3 APPLICAZIONI INDUSTRIALI	11
1.4 SCOPO DEL LAVORO	12
CAPITOLO 2 – Materiali e metodi	13
2.1 ANIDRIDE CARBONICA IN FASE SUPERCRITICA	13
2.2 IMPIANTO DI PASTORIZZAZIONE	14
2.3 COLLAUDO E TEST DI FUNZIONAMENTO DELL'IMPIANTO	17
2.4 MATRICI ALIMENTARI TRATTATE	19
2.5 PROCEDURA OPERATIVA	20
2.5.1 Preparazione dei campioni liquidi.....	20
2.5.2 Preparazione dei campioni solidi	21
2.5.3 Procedura sperimentale	21
2.6 MICRORGANISMI E LORO DETERMINAZIONE.....	22
2.6.1 Carica microbica totale.....	23
2.6.2 <i>Escherichia coli</i> e coliformi totali	23
2.6.3 Lattobacilli	23
2.6.4 Muffe e lieviti.....	23
2.6.5 <i>Salmonella enterica</i>	24
CAPITOLO 3 – Risultati sperimentali preliminari su substrato liquido	25
3.1 CINETICHE DI DISATTIVAZIONE DI <i>ESCHERICHIA COLI</i>	25
3.2 CINETICHE DI DISATTIVAZIONE DI <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	27
CAPITOLO 4 – Risultati sperimentali su substrato solido	31
4.1 CINETICHE DI DISATTIVAZIONE DI <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SU COCCO.....	31
4.2 CINETICHE DI DISATTIVAZIONE DELLA FLORA NATURALE DEL COCCO	37
4.3 CINETICHE DI DISATTIVAZIONE DI <i>ESCHERICHIA COLI</i> SU CAROTA	40
4.4 CINETICHE DI DISATTIVAZIONE DELLA FLORA NATURALE DELLA CAROTA	43
CAPITOLO 5 – Correlazione dei dati sperimentali e ipotesi di meccanismo	47
5.1 POSSIBILE MECCANISMO DI AZIONE DEL TRATTAMENTO COMBINATO	47

5.2 MODELLO DI FITTING.....	50
5.2.1 Cinetiche di <i>S.enterica</i> e flora naturale sul cocco	50
5.2.2 Cinetiche di <i>E.coli</i> e flora naturale sulla corota	59
5.3 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	70
CONCLUSIONI	71
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	73

Introduzione

Le malattie di origine alimentare sono un problema molto diffuso nella società contemporanea e per questo motivo sono una importante causa di perdite economiche in termini di spesa sanitaria e danni nei confronti delle aziende produttrici.

L'industria alimentare deve quindi rivolgere particolare attenzione all'utilizzo di tecniche di pastorizzazione che garantiscano l'igiene e il mantenimento delle proprietà nutritive dei prodotti alimentare nel tempo.

Attualmente, per il trattamento dei prodotti alimentari, si utilizzano principalmente processi termici che sfruttano l'effetto distruttivo che il calore ha sulla maggioranza dei microrganismi ed enzimi dannosi che causano il deterioramento degli alimenti.

Il calore, tuttavia, è responsabile di un generale degrado qualitativo dell'alimento soprattutto dal punto di vista organolettico andando ad alterare odore colore e consistenza, ma anche da un punto di vista nutrizionale, causando una denaturazione di vitamine e proteine.

La crescente attenzione da parte del consumatore nei confronti della sicurezza dei prodotti alimentari e i recenti studi indicanti gli effetti benefici di prodotti contenenti antiossidanti, hanno acceso l'interesse verso tecniche di pastorizzazione alternative, che superino questi inconvenienti, mantenendo inalterata la sicurezza igienica e la stabilità dell'alimento.

Una delle tecnologie tra le più interessanti e promettenti è la pastorizzazione mediante l'uso di CO₂ allo stato supercritico in quanto, è un trattamento che può essere applicato a un gran numero di prodotti, è facilmente eliminabile dai substrati trattati, è inodore, incolore, non tossico ed economico.

Il meccanismo di inattivazione dei microrganismi tramite l'uso di CO₂ supercritica, a causa della sua complessità, non è ancora stato definito con certezza. Si suppone che esso sia causato da una serie di stadi collegati tra loro basati sulla buona proprietà di solubilità della CO₂ nei mezzi acquosi; nella capacità di penetrare attraverso la membrana cellulare, influenzare negativamente l'attività enzimatica e di acidificare il mezzo in cui si dissolve alterando perciò gli equilibri osmotici.

Gli ultrasuoni sono un'altra tecnologia utilizzata nei processi di pastorizzazione, generalmente applicati ad un trattamento termico in modo da accelerare il processo di disattivazione. Anche in questo caso i vantaggi riscontrati sono una migliore conservazione delle caratteristiche nutrizionali e organolettiche del campione.

La ricerca negli anni si è concentrata essenzialmente sul trattamento, con CO₂ in pressione, di substrati liquidi, mentre solo recentemente sono stati condotti dei lavori relativi alla pastorizzazione di matrici solide alimentari.

A causa della necessità di utilizzare condizioni di trattamento molto spinte per garantire una buona disattivazione della flora naturale di cocco e carota e di *Salmonella enterica* inoculata su cocco, si è pensato di mettere a punto un sistema di pastorizzazione accoppiando al trattamento con CO₂ in pressione gli ultrasuoni. L'obiettivo è quello di modulare i parametri del trattamento ovvero la pressione, la temperatura e il tempo in modo da preservare le caratteristiche del campione.

Il trattamento combinato di ultrasuoni e CO₂ in pressione è stato lo spunto per questa tesi. Questo è stato applicato per studiarne l'efficacia nell'inattivazione delle specie microbiche naturalmente presenti od inoculate, su cocco e carota, che si sono mostrate resistenti al processo di pastorizzazione con CO₂ in pressione.

Nel Capitolo 1 viene riportata la letteratura scientifica riguardante l'uso della CO₂ supercritica e gli ultrasuoni nei processi di disattivazione.

Nel Capitolo 2 sono descritti l'impianto utilizzato nelle prove di pastorizzazione, le metodologie operative e i test di funzionamento del generatore di ultrasuoni.

Nel Capitolo 3 sono riportati i risultati ottenuti con substrato liquido, condotti allo scopo di verificare l'effetto sinergico del processo che utilizza simultaneamente CO₂ e ultrasuoni.

Nel Capitolo 4 sono riportati i risultati del trattamento applicato alle matrici solide alimentari.

Nel Capitolo 5 sono presentate e discusse delle ipotesi per il meccanismo di disattivazione del trattamento combinato e sono correlate le cinetiche di abbattimento utilizzando il Modello di Weibull modificato.

Il lavoro di tesi è stato svolto nell'ambito del progetto scientifico PRESERF (Processing Raw Materials into Excellent and Sustainable End products while Remaining Fresh), finanziato dall'Unione Europea nell'ambito del VII programma quadro.

Lo scopo di questo progetto è quello di sviluppare tecnologie innovative per la conservazione degli alimenti cosiddetti ready to eat, attraverso l'analisi dei parametri indicatori della qualità e sicurezza dell'alimento trattato.

L'Università di Trento, la cui coordinatrice è l'Ing. Sara Spilimbergo, è uno dei partner del progetto, assieme alle Università di Lund (Svezia) e Zagabria (Croazia), all'istituto per l'alimentazione e biotecnologia svedese (SIK) e da due aziende olandesi (FeyeCon, che si occupa dell'applicazione della CO₂ supercritica in campo farmaceutico e alimentare, e VNK B.V. azienda specializzata nella produzione, lavorazione e conservazione di vegetali), e si occupa dello sviluppo di un processo di pastorizzazione alternativo a quello termico.

Desidero ringraziare vivamente, l'Ing. Sara Spilimbergo e la dott.ssa Giovanna Ferrentino, dell'Università di Trento per la possibilità offertami di partecipare a questo progetto, ed il Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e Tecnologie Industriali nei cui laboratori ho svolto la parte sperimentale del lavoro.

Capitolo 1

Pastorizzazione con CO₂ supercritica e ultrasuoni

In questo capitolo sono riportate considerazioni generali e lo stato dell'arte riguardante il processo di pastorizzazione con fluidi supercritici e il meccanismo di inattivazione microbica dovuto alla CO₂ supercritica e agli ultrasuoni.

1.1 Pastorizzazione con CO₂ supercritica: stato dell'arte

L'utilizzo dell'anidride carbonica (CO₂) ad alte pressioni o in fase supercritica per la pastorizzazione di substrati solidi, è una tecnologia di recente studio, nonostante siano già stati pubblicati numerosi lavori che dimostrano l'efficacia dello stesso applicato a substrati ed alimenti liquidi.

Come per i liquidi, anche per gli alimenti solidi si è osservato che il potere sanitizzante della CO₂ dipende dal tempo di trattamento, dalla temperatura e dalla pressione.

Esperimenti effettuati su pezzi di cocco (Ferrentino et al., 2012) hanno dimostrato che il trattamento induce una riduzione della flora naturale presente nell'alimento: in particolare si è osservato che la sopravvivenza dei microrganismi mesofili decresce aumentando la pressione da 8 a 12 MPa alla temperatura di 35°C: dopo 60 minuti di trattamento a 8 MPa si ottiene una riduzione di 2.5 unità logaritmiche, mentre a 12 MPa si ha inattivazione pari a 2.5 unità logaritmiche. Alla temperatura di 25°C, invece, l'aumento di pressione non ha un effetto apprezzabile sulla cinetica di inattivazione.

Questo comportamento è associato alle proprietà della CO₂ che alla temperatura di 25°C è in una fase subcritica, mentre a 35°C è in fase supercritica. In queste condizioni un aumento di pressione corrisponde ad un drastico aumento della densità e del potere solvatante, provocando un aumento di volume del doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare con la conseguente estrazione di costituenti vitali dalla cellula e dalla membrana (Garcia-Gonzales et al., 2007).

Altre prove condotte aumentando la pressione da 12 a 14 MPa alla temperatura di 35°C hanno dimostrato effetti meno significativi sulla cinetica di disattivazione della microflora mesofila. Risultati simili sono stati raggiunti su substrati liquidi (Sims e Estigarribia 2003) e substrati

solidi (Valverde et al., 2010). Questo comportamento può essere spiegato considerando che oltre i 10 MPa la solubilità della CO₂ dipende poco dalla pressione.

Mantenendo costante la pressione, l'aumento di temperatura ha un effetto positivo sulla cinetica di inattivazione microbica. La temperatura di trattamento, infatti, è strettamente correlata al trasferimento di massa della CO₂: le alte temperature aumentano la sua diffusività e la fluidità della membrana cellulare facilitando quindi la diffusione della CO₂ al suo interno. Le condizioni di trattamento analizzate su pezzi di cocco sono state: 25°C e 35°C a 8 e 12 MPa e 40°C e 45°C a 12 MPa. Gli effetti della temperatura sull'inattivazione microbica sono riportati anche in altri studi riguardanti l'uso di questo trattamento con alimenti solidi.

Valverde et al. (2010) hanno applicato il trattamento per l'inattivazione di *Saccharomyces Cerevisiae* inoculata su pezzi di pera, un alimento scelto come esempio di cibo pronto al consumo. Si è osservato come la sopravvivenza dei lieviti diminuisce all'aumentare della temperatura di trattamento. Il trattamento a 50°C per 10 minuti riduce la carica microbica di 4 unità logaritmiche mentre l'applicazione della sola temperatura riduce la carica microbica di meno di 2 unità.

Anche in questo lavoro è stato osservato come un aumento di pressione (6-30 MPa) influenzi debolmente la cinetica di inattivazione.

Inoltre, dopo il trattamento sono state effettuate delle prove per valutarne l'effetto sulle caratteristiche qualitative della pera. Il trattamento con CO₂ non influenza il pH, ma si osserva una perdita di consistenza che aumenta in modo più marcato all'aumentare della pressione di trattamento.

Recentemente Ferrentino et al. (2012) hanno applicato il trattamento di pastorizzazione con CO₂ supercritica per studiarne l'efficacia sull'inattivazione di *Listeria monocytogenes* inoculata sulla cotica del prosciutto crudo.

I risultati sperimentali hanno dimostrato che alla temperatura di 35°C un aumento di pressione da 8 a 12 MPa non influisce in modo significativo sulla cinetica di inattivazione microbica, e dopo 15 minuti di trattamento la cinetica raggiunge un plateau. Questo fenomeno può essere ipotizzato considerando l'esistenza di microrganismi più o meno sensibili alle condizioni di trattamento. Una volta che la frazione più sensibile è stata inattivata, il processo si arresta e la frazione più resistente sopravvive finché non vengono applicate condizioni di trattamento più intense. A 50°C si osserva un diverso comportamento perché, entrambe le frazioni microbiche, più e meno sensibili, sono inattivate e l'effetto della pressione diviene evidente. Sono necessari 45 min a 8 MPa per ottenere una riduzione della carica microbica di 7 unità logaritmiche, inattivazione che viene raggiunta in soli 15 min a 12 MPa.

Sono state, inoltre, condotte analisi colorimetriche sul campione durante il trattamento in modo da determinarne l'effetto sulle caratteristiche del prosciutto. Si è visto che la riflettanza del campione trattato non è differente da quella del campione non trattato. Gli spettri acquisiti durante il trattamento a diversi tempi (5, 15, 30 min a 45°C e 1, 5, 15 min a 50°C) sono

sovrapponibili, indicando la stabilità del colore. Anche i parametri L*, a* e b* relativi al colore non cambiano significativamente a seguito del trattamento.

1.1.1 Meccanismo di disattivazione microbica

Nonostante i numerosi studi effettuati, non è ancora stato possibile definire con certezza, a causa della sua complessità, il meccanismo di inattivazione dei microrganismi tramite l'uso di CO₂ supercritica.

Si è supposto che l'inattivazione microbica mediante CO₂ supercritica sia il risultato dell'azione sinergica di più fenomeni che avvengono contemporaneamente.

Nel 1985 Daniels et al. indicano come causa di inibizione della crescita e del metabolismo l'abbassamento del pH intracellulare, (la CO₂ sciogliendosi nel citoplasma forma H₂CO₃ il quale si dissocia in H⁺, HCO₃⁻ e CO₃²⁻), influenzando quindi l'attività enzimatica con l'inibizione di processi importanti come la glicolisi, il trasporto attivo di ioni e, come proposto da Dillow et al. (1999), provocando la permeabilizzazione della membrana cellulare.

Hong et al. (1997), verificarono che la permeabilizzazione della membrana da parte della CO₂ promuove l'estrazione di componenti fondamentali per la sopravvivenza della cellula.

Spilimbergo et al. (2007) hanno proposto un meccanismo di inattivazione suddiviso in sette stadi riassunti in Figura 1.1:

1. Come primo step la CO₂ pressurizzata si dissolve nella fase acquosa extracellulare dove il gas si può sciogliere per formare acido carbonico H₂CO₃ che a sua volta si dissocia in bicarbonato HCO₃²⁻ ($K_{HA} \cong 10^{-7}$) per poi formare carbonato CO₃²⁻ ($K_{HA} \cong 10^{-11}$).
Si ha quindi diminuzione del pH extracellulare che tuttavia non viene ritenuta sufficiente per essere letale ma contribuisce all'inibizione della crescita e alla diminuzione della resistenza microbica a causa di un aumento del consumo di energia per mantenere l'omeostasi.
2. Successivamente, si ha una modificazione della membrana cellulare in quanto l'anidride carbonica supercritica si dissolve nel doppio strato fosfolipidico (Spilimbergo et al. 2002) alterandone così la fluidità e permeabilità.
3. Si osserva, inoltre, una diminuzione del pH intracellulare. I microrganismi hanno un meccanismo per il controllo e la regolazione del pH quali tamponi citoplasmatici, produzione di acidi e basi e pompe protoniche. Quando la CO₂ si solubilizza nel citoplasma la sua concentrazione determina uno squilibrio metabolico per cui la cellula non è più in grado di contrastare la diminuzione del pH intracellulare e questo porta ad una diminuzione della vitalità cellulare.

4. L'abbassamento del pH influenza l'attività enzimatica, particolarmente sensibile alle variazioni di pH, provocando un difficile controllo dei processi metabolici essenziali come l' ATP sintetasi, la sintesi di RNA e proteine, la replicazione del DNA o la crescita cellulare.
5. Le elevate concentrazioni di CO_2 e HCO_3^- possono, inoltre, influenzare le reazioni catalizzate da carbossilasi e decarbossilasi che svolgono un ruolo fondamentale in molte attività enzimatiche come, ad esempio, la sintesi di amminoacidi e acidi nucleici, causando quindi l'inibizione dell'attività cellulare.
6. L'accumulo di CO_2 nel citoplasma sposta l'equilibrio di dissociazione dell'acido carbonico verso la formazione di CO_3^{2-} il quale potrebbe reagire con degli elettroliti inorganici, come Ca^{2+} , Mg^{2+} formando dei precipitati ed alterando il bilancio elettrolitico intracellulare.

Gli elettroliti inorganici sono fondamentali nel mantenimento dell' equilibrio della pressione osmotica e quindi, si potrebbero avere effetti deleteri sul volume cellulare.

Inoltre alcuni tipi di proteine che si legano allo ione Ca^{2+} possono perdere la loro funzionalità per la mancanza dello ione.

7. Si è ipotizzato che un'altra causa di inattivazione cellulare è la rimozione di costituenti vitali dalla cellula e dalla membrana cellulare. L'accumulo di CO_2 nelle cellule incrementerebbe la densità interna fino ad un livello critico, estraendo dei costituenti, come fosfolipidi e composti idrofobici, fondamentali sia dal punto di vista strutturale che metabolico per le cellule.

Questo processo estrattivo sembra essere favorito dal rilascio della pressione, il quale velocizza il trasferimento di materiale dall'ambiente citoplasmatico a quello esterno alla membrana.

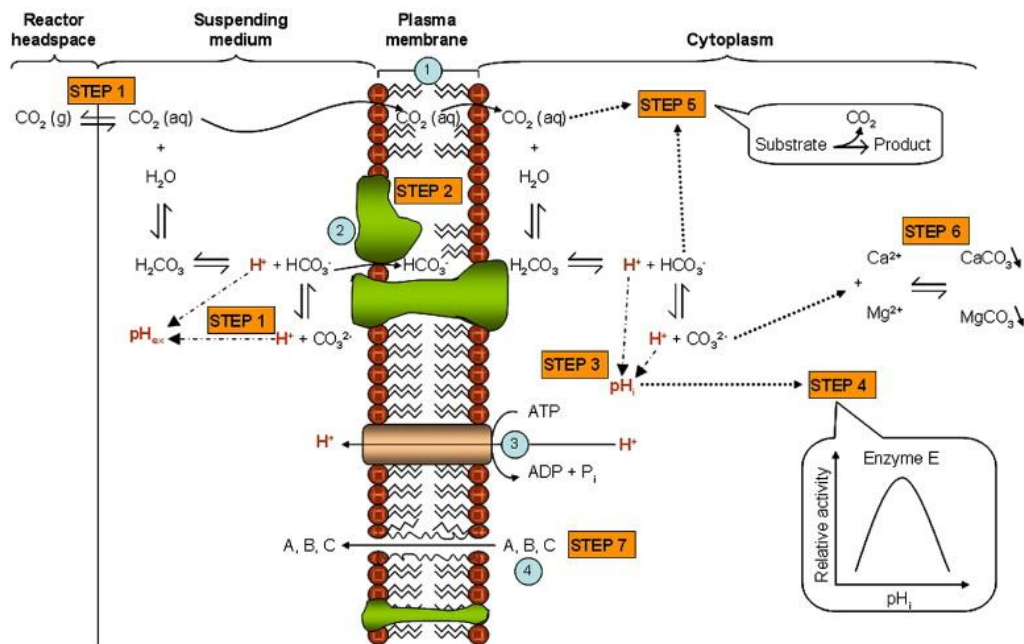


Figura 1.1. Schema dei sette stadi del processo di disattivazione microbica esercitata dalla CO₂ in pressione. Sono inoltre indicati il doppio strato fosfolipidico (1), Proteine di membrana (2), una proteina di trasporto H⁺-ATPasi della membrana cellulare (3) e elementi intracellulari (4)

Nel caso di trattamento di matrici alimentari solide, non essendoci una fase liquida in cui la CO₂ deve sciogliersi prima di entrare in contatto con la cellula, lo stadio 2 del processo di disattivazione microbica non è presente in modo significativo, e, la disattivazione inizierà con la solubilizzazione della CO₂ nel doppio strato fosfolipidico.

1.2 Pastorizzazione con ultrasuoni: stato dell'arte

Gli ultrasuoni sono un'altra tecnologia utilizzata nei processi di pastorizzazione, essi accoppiati ai processi termici, possono accelerare il processo di inattivazione microbica, diminuendo quindi la durata e l'intensità dei trattamenti termici.

Rispetto a questi, i vantaggi degli ultrasuoni sono: una minor perdita di sapore, specialmente nei succhi, una maggior omogeneità di trattamento e un risparmio energetico.

Boysen et al. (2009) hanno condotto delle prove di inattivazione su carne di pollo combinando un trattamento termico con vapore e ultrasuoni alla frequenza di 30-40 KHz. In un tempo di trattamento compreso tra 0.5 e 2 secondi si ottiene un abbattimento della flora naturale superiore ai 2.5 log.

Morild et al. (2010) hanno studiato l'abbattimento di patogeni attraverso un trattamento con vapore ed ultrasuoni sulla pelle e carne di maiale.

L'effetto degli ultrasuoni è di aumentare l'efficacia del trattamento con vapore rompendo il sottile strato di liquido sulla superficie del campione. Le condizioni di trattamento analizzate sono state: vapore a 135°C e ultrasuoni alla frequenza di 30-40 KHz. I tempi di trattamento analizzati per l'inattivazione di *Salmonella Infantys*, *Derby*, *Typhimurium*, sono 0 e 1 s, mentre per *Salmonella typhimurium*, *E. coli* e *Y. Enterocolitica* sono 0, 0.5, 1, 1.5 e 2 s. Partendo da un inoculo con concentrazione di 10^4 UFC/cm² (unità formanti colonie per cm² di superficie del campione) dopo 2 secondi di trattamento la concentrazione di *E. Coli* viene ridotta di 2.9 e 2.5 log rispettivamente sulla pelle e sulla carne. *S. typhimurium* viene ridotta di 2.8 e 2.1 unità logaritmiche mentre *Y. Enterocolitica* di 2.5 e 2.1 unità logaritmiche. Con un inoculo di 10^7 UFC/cm² *E. coli* viene ridotta di 3.3 e 2.5 log, *S. typhimurium* di 3.2 e 2.0 log mentre *Y. Enterocolitica* di 3.6 e 2.1 log.

Si è osservato che i campioni trattati per un tempo superiore ai 2 secondi cambiano notevolmente il loro aspetto.

Alcuni articoli indicano come *L. monocytogenes* possa essere inattivata da un trattamento con ultrasuoni combinato ad altre tecnologie. Un trattamento a 20 KHz e 117 µm a temperatura ambiente non risulta molto efficiente, visto che richiede un tempo di riduzione decimale di 4.3 min. Combinando gli ultrasuoni con una pressione in aria di 200 KPa il tempo di riduzione decimale cala a 1.5 min, mentre a 400 kPa cala ulteriormente a 1 minuto (Pagan et al. 1999). Aumentando invece di 100 µm l'ampiezza, la quale rappresenta il massimo spostamento, rispetto alla posizione di equilibrio, che le molecole del mezzo di propagazione compiono al passaggio dell'onda, la resistenza di *L. monocytogenes* diminuisce di un fattore 6. Temperature superiori ai 50°C non risultano avere un effetto positivo sulla cinetica di inattivazione.

Nel trattamento di campioni di cioccolato (Lee et al., 1989) con una potenza di 100 W a 160 KHz di frequenza si ottiene una riduzione di 4 unità logaritmiche di *Salmonella* dopo un tempo di trattamento di 10 minuti in una soluzione di peptone, mentre si osserva una lieve differenza nel tempo di riduzione decimale (D) tra *Salmonella Eastbourne* (3 min) e *Salmonella Anatum* (2.1 min) trattate con una potenza di 100 W a 160 KHz e 5°C.

Per quanto riguarda il trattamento combinato di ultrasuoni e CO₂ le prime prove riportate in letteratura sono state condotte da Ortuno et al. (2012).

Il microrganismo utilizzato per le prove sperimentali è stato *E. coli*, inoculato in 60 ml di LB, succo di mela e arancia in modo da avere una carica microbica di partenza di circa 10^7 UFC/ml.

Le prove sono state eseguite a diverse condizioni di temperatura e pressione con e senza l'uso di ultrasuoni alla potenza di 40 W, ed alla frequenza di 30 KHz. Le condizioni di trattamento applicate per la CO₂ sono state: 36°C alle pressioni di 10.0, 22.5, 29.0 e 35.0 MPa (per valutare l'effetto della pressione sulla cinetica) e alla pressione di 22.5 MPa alle temperature di 31°C, 36°C e 41°C (per valutare l'effetto della temperatura).

Nelle prove condotte senza gli ultrasuoni a differenti pressioni si osserva che la cinetica di inattivazione ha una prima fase stazionaria seguita da una cinetica di abbattimento esponenziale; la fase stazionaria corrisponde alla morte della frazione più sensibile dei microrganismi.

La cinetica di inattivazione a 10.0 e 22.5 MPa è molto simile, ma aumentando la pressione a 29.0 e 35.0 MPa la durata della fase stazionaria si riduce notevolmente da 30 minuti a 20 e 15 minuti. Il tempo necessario per ridurre la carica microbica di 8 unità logaritmiche passa dai 60 e 55 minuti necessari a 10.0 e 20.0 MPa, a 35 minuti per il trattamento a 29.0 MPa, e a 25 minuti per quello a 35.0 MPa.

Accoppiando al trattamento in pressione gli ultrasuoni scompare la prima fase stazionaria e la sopravvivenza dei microrganismi cala drasticamente rendendo sufficiente un trattamento di 2 minuti per ottenere un inattivazione di 8 unità logaritmiche alle pressioni di 10.0, 22.5 e 29.0 MPa. Alla pressione di 35.0 MPa invece si osserva una riduzione di 6 unità logaritmiche nei primi 2 minuti e sono poi necessari altri 3 minuti di trattamento per arrivare a una riduzione complessiva di 8 unità.

Il vantaggio dato dall'uso degli ultrasuoni consiste in una migliore miscelazione del campione, da cui deriva un migliore contatto tra la CO₂ e la fase liquida, con conseguente miglioramento della solubilizzazione della CO₂ nel doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare, ed un rapido abbassamento del pH intracellulare. Il miglioramento del "mass transfer" promuove anche l'estrazione di costituenti vitali dalla cellula velocizzandone la morte.

Il rallentamento nella cinetica di inattivazione a 35.0 MPa può essere causato da un più blando effetto del campo acustico a causa dell'alta pressione la quale può influenzare la trasformazione dell'energia elettrica in meccanica durante il trattamento ad ultrasuoni. Inoltre, in condizioni di trasmissione del campo acustico attraverso il substrato, i fenomeni di micro agitazione e di cavitazione dati dalle onde di pressione possono essere influenzati dall'alta pressione modificando quindi la capacità estrattiva degli ultrasuoni e della CO₂.

Nelle prove condotte variando la temperatura le cinetiche di inattivazione mostrano sempre una prima fase stazionaria seguita poi da una cinetica di inattivazione del primo ordine. La durata della fase stazionaria a 31°C e 36°C è simile e dura circa 30 minuti, a 41°C cala a 20 minuti. Il tempo necessario per raggiungere un inattivazione di 8 unità logaritmiche è invece di 75 minuti a 31°C, di 55 minuti a 36°C e 40 minuti a 41°C.

Le cinetiche ottenute combinando gli ultrasuoni al trattamento con CO₂ sono invece sovrapponibili al variare della temperatura e sono necessari solo 2 minuti di trattamento per ridurre la carica microbica di 8 unità logaritmiche.

In conclusione gli ultrasuoni velocizzano il meccanismo di inattivazione, ma l'effetto dato dall'innalzamento della temperatura sul mass transfer è trascurabile rispetto a quello dato

dall'uso degli ultrasuoni. Diversamente dalla pressione la temperatura non ha effetti sulle prestazioni del trasduttore.

1.2.1 *Meccanismo di disattivazione microbica*

Gli ultrasuoni possono essere definiti come onde di pressione con una frequenza di 20 KHz o superiore; generalmente le apparecchiature ad ultrasuoni producono ultrasuoni ad una frequenza compresa tra 20 KHz e 10 MHz. Ultrasuoni ad alta potenza e bassa frequenza da 20 a 100 KHz sono in grado di causare fenomeni di cavitazione che vengono sfruttati nei processi dell'industria alimentare per inattivare i microrganismi.

Il meccanismo di inattivazione è legato principalmente all'assottigliamento della membrana cellulare, a un effetto di riscaldamento localizzato ed alla produzione di radicali liberi.

Durante il processo di sonicazione, quando le onde sonore incontrano il liquido, si formano onde longitudinali che creano regioni in cui si verificano in modo alternato fenomeni di compressione ed espansione. Questi cambiamenti di pressione causano cavitazione, cioè la formazione di bolle che durante la fase di espansione hanno un'ampia area superficiale che favorisce un aumento della diffusione del gas. Ad un certo punto l'energia fornita dagli ultrasuoni non è più sufficiente a mantenere in fase vapore le bolle le quali condensano rapidamente. Durante questa rapida condensazione le molecole urtano tra di loro molto velocemente creando onde d'urto che hanno come effetto la formazione di regioni ad alta temperatura (oltre i 550°C) e alta pressione (50000 KPa). Questi violenti sbalzi di pressione sono responsabili dell'effetto battericida degli ultrasuoni, mentre l'effetto degli "hot spot" sui batteri è presente, ma è molto localizzato.

L'efficacia del trattamento ad ultrasuoni dipende dal batterio trattato. Alcuni microrganismi, in particolare le spore, sono molto resistenti e richiedono lunghi tempi di trattamento. Spesso gli ultrasuoni sono utilizzati in combinazione con altre tecnologie come la pressione (manosonic), la temperatura (thermosonic) o entrambe (manothermosonic); in questo modo si ottiene un effetto battericida maggiore rispetto a quello dato dalle singole tecnologie.

Le grandezze caratteristiche coinvolte nel processo battericida sono: l'ampiezza degli ultrasuoni, il tempo di trattamento, il volume trattato e la composizione dell'alimento.

È noto che gli ultrasuoni sono una tecnologia in grado di distruggere le cellule causando un rilascio dei componenti intracellulari ma, non sono ancora noti con precisione i meccanismi coinvolti, in particolare non è stata ancora valutata la dipendenza della morte cellulare con l'energia applicata durante il processo di sonicazione. Foladori et al. 2007, hanno determinato che la sopravvivenza di *E.coli* in acque reflue, sottoposte ad un trattamento con ultrasuoni, non è influenzata da energie inferiori agli 80 KJ/L.

Barbosa Canovas et al. 2008, hanno condotto delle prove di inattivazione dei batteri mesofili del latte con ultrasuoni, in questo caso sono state ottenute disattivazioni di circa 3 log applicando energie nell'ordine dei 400 KJ/L.

1.3 Applicazioni industriali

Non sono state trovate in letteratura applicazioni industriali del trattamento con ultrasuoni per la disattivazione microbica.

Per quanto riguarda invece la CO₂ supercritica le applicazioni industriali che la utilizzano come metodo di disattivazione microbica sono pochissime, nonostante le numerose ricerche fatte per dimostrare i benefici di questa tecnologia nel mantenere intatte le proprietà organolettiche e la sua efficacia nella riduzione microbica.

I maggiori sforzi per la commercializzazione di un impianto di trattamento con CO₂ supercritica sono stati compiuti dalla Praxair Inc. con la tecnologia concessa in licenza dall'Università della Florida (Balaban e Ferrentino, 2012)

Sono state costruite numerose unità dimostrative in grado di processare circa 1.5 L/min di prodotto liquido, ed è stato poi testato un impianto di produzione di succhi in grado di trattare 150 L/min.

Marc Sims (Porocrit LLC, Berkley, CA) ha progettato una membrana costituita da fibre cave per un processo di pastorizzazione in continuo di succhi di frutta con CO₂ supercritica: all'interno della membrana viene fatto passare il liquido, mentre la CO₂ che si trova all'esterno diffonde attraverso la membrana nel liquido.

L'unica altra attività progettata a livello industriale consiste in un impianto pilota per il trattamento in continuo di alimenti liquidi prodotto da Mitsubishi Kakoki Co. (Tokyo, Japan) per la Shimadzu (Kyoto, Japan).

L'utilità commerciale e le capacità complessive dell'impianto pilota della Porocrit LLC sono state valutate nel 2000 al Chicago Research Center della Air Liquide in collaborazione con il progettista della membrana (Marc Sims). I prodotti inizialmente trattati sono stati acqua, succo di arancia, mela – limone - zenzero e carota alle condizioni di 7.3 MPa, 40°C, 6.5 g CO₂/min con una portata di 100 ml/min di prodotto.

La CO₂ supercritica si è dimostrata molto efficace nell'inattivare la flora naturale costituita da muffe e lieviti e lattobacilli nei succhi di arancia, carota, mela limone e zenzero.

La formazione di acido carbonico durante il processo con CO₂ supercritica ha portato ad un abbassamento del pH da 6.6 a 6 nel succo di mela – limone – zenzero e da 6.3 a 5.8 nel succo

di carota, mentre il pH del succo di arancia non ha subito modificazioni. Anche le percentuali zuccherine non hanno subito cambiamenti durante il processo.

È stata utilizzata inoltre una tecnica di gas cromatografia per valutare i componenti aromatici volatili; i componenti maggiormente colpiti dal processo sono limonene, linalolo, α -pinene i quali sono stati rilevati in concentrazioni molto minori rispetto a quelle nel prodotto non trattato.

Per valutare l'effetto del trattamento sulle proprietà nutrizionali è stato scelto come indicatore la vitamina C, ed è stata quantificata la sua concentrazione nei campioni trattati mediante cromatografia liquida ad alta pressione. Dai risultati si è visto che la perdita di vitamina C è dell'ordine del 3% rispetto al campione non trattato.

1.4 Scopo del lavoro

Lo scopo di questa tesi è stato di valutare la fattibilità di un processo di trattamento combinato con ultrasuoni e CO₂ in pressione per l'inattivazione di microrganismi presenti naturalmente (od inoculati) su substrati alimentari solidi.

Per ogni alimento campione sono state individuate le condizioni ottimali di processo, in particolare la combinazione di pressione e temperatura che permette di ottenere l'inattivazione microbica nel minor tempo possibile e che, contemporaneamente, non comporta inaccettabili modifiche delle caratteristiche organolettiche degli alimenti.

Capitolo 2

Materiali e metodi

In questo capitolo sono descritti i materiali impiegati, le apparecchiature utilizzate, i test di collaudo effettuati sull'impianto presente nel Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Trento e le procedure operative seguite durante le prove sperimentali.

2.1 Anidride carbonica in fase supercritica

Il gas utilizzato durante il processo di pastorizzazione è l'anidride carbonica, che numerosi studi hanno dimostrato di essere adatta al trattamento di substrati alimentari poiché è inodore, incolore e non tossica. La sua efficacia aumenta quando si trova in fase supercritica, cioè in condizioni di temperatura e pressione superiori al punto critico, in corrispondenza del quale, le fasi gassosa e liquida diventano indistinguibili.

In Figura 2.1 è rappresentato il diagramma di fase della CO_2 in cui è mostrato il punto critico a temperatura di 31°C e pressione di 73 bar.

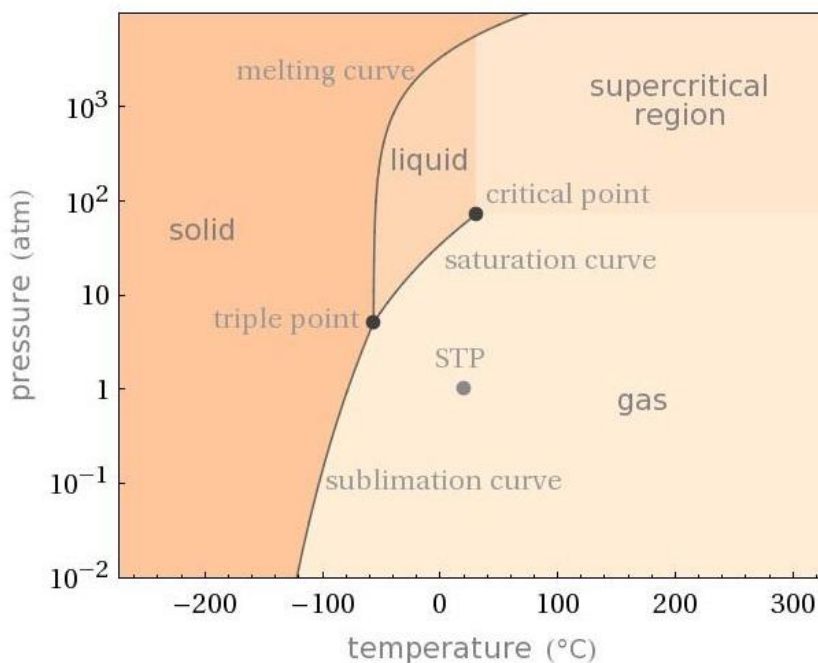


Figura 2.1. *Diagramma di stato della CO_2*

La CO₂ in fase supercritica ha proprietà intermedie tra quelle dello stato liquido e quello gassoso; in particolare ha la densità di un liquido che le conferisce un buon potere solvante e la viscosità di un gas che ne favorisce la diffusione attraverso substrati solidi e liquidi.

2.2 Impianto di pastorizzazione

L'impianto utilizzato per le prove sperimentali, rappresentato in Figura 2.2, è costituito da: una linea di tubi in AISI 316 da 1/8", una bombola di CO₂, una pompa volumetrica a membrana (Gilson mod.307), un bagno criostatico (MPM, mpd M408 BC), un reattore in vetro zaffiro (Separex S.A.S.), un bagno termostato per il controllo della temperatura durante il trattamento, una sonda di temperatura (Thermometer 305 P) ed un manometro.

L'apparecchiatura ad ultrasuoni (AckiveArc Sarl) è costituita da un generatore di ultrasuoni, un sonotrodo ed un trasduttore.

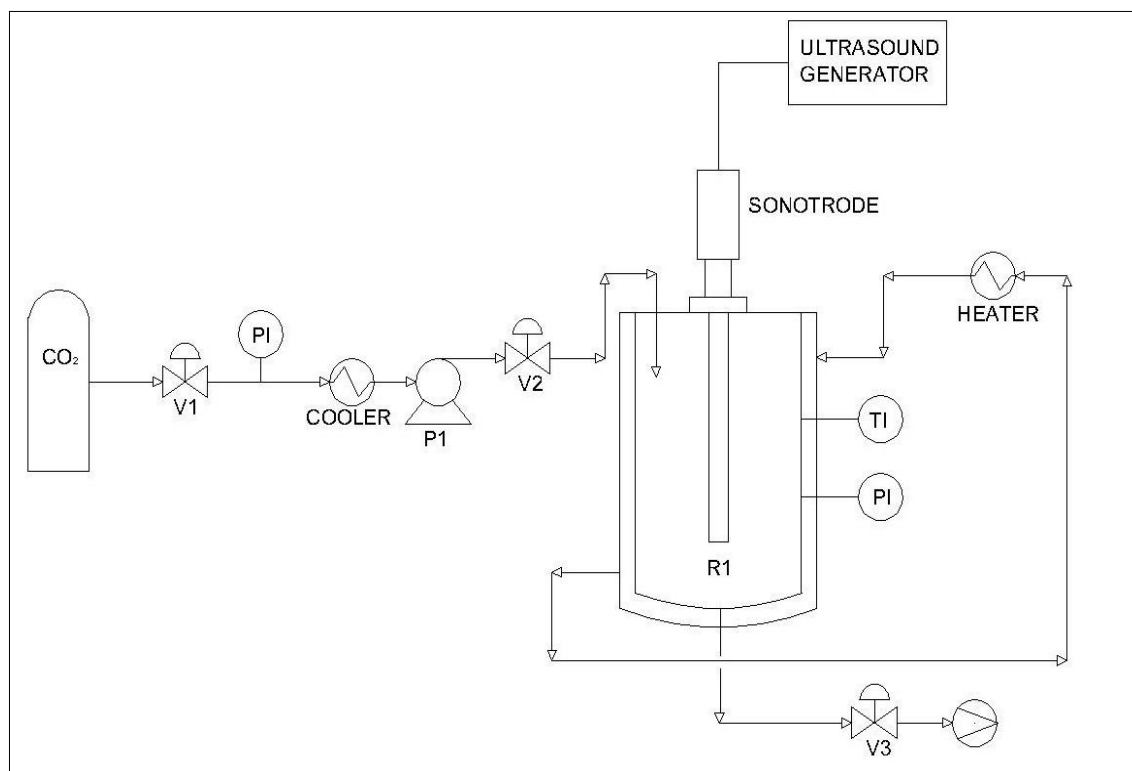


Figura 2.2. Schema dell'impianto di pastorizzazione

L'alimentazione dell'impianto avviene con CO₂ stoccata in una bombola con tubo pescante, di purezza pari al 99,9% alla pressione di circa 60 bar (Messer S.p.A). Il gas in uscita dalla

bombola passa attraverso un filtro di porosità 2 μm (Rotarex) atto a bloccare eventuali impurezze solide ed evitare l'intasamento della pompa. La tubazione di alimentazione del gas in uscita dalla bombola e la testata della pompa sono raffreddate mediante un bagno criostatico alla temperatura di -5°C , in modo da evitare che il gas passi allo stato vapore, mandando in cavitazione la pompa.

La pompa utilizzata è una pompa volumetrica a membrana (Gilson mod.307), operante con una portata massima di 23 ml/minuto e pressione massima di 600 bar.

Il reattore in cui avviene il trattamento ha pareti in vetro zaffiro (Separex S.A.S.), con un volume interno di 50 ml, diametro 25 mm e altezza 100 mm, e può raggiungere una pressione massima di esercizio pari a 400 bar, con una temperatura variabile da -10°C a 100°C . Il corpo del reattore è avvolto da una camicia di riscaldamento di volume pari a 100 ml in grado di regolare la temperatura nel reattore grazie alla circolazione di acqua a temperatura costante fornita da un bagno termostato (Julabo). Temperatura e pressione del sistema sono controllate da una sonda di temperatura (Thermometer 305 P) ed un manometro collegati al reattore.

Il reattore, in sede di collaudo, è stato testato fino ad una pressione di 600 bar ed è fornito di un disco di rottura per evitare eventuali sovrappressioni del sistema secondo lo Standard Europeo EN ISO 4126-2. La pressione di rottura del disco alla temperatura di 22°C è compresa tra 415 e 435 bar.

In uscita dal reattore, sulla linea di depressurizzazione dell'impianto, sono presenti una valvola a sfera ed una valvola micrometrica che permettono di regolare la portata di scarico della CO_2 . La linea di scarico e le valvole sono coibentate e riscaldate in modo da evitare la formazione di ghiaccio a causa della laminazione della CO_2 durante la depressurizzazione.

L'apparecchiatura ad ultrasuoni (AckiveArc Sarl), riportata in Figura 2.3 e 2.4 ed utilizzata per le prove, è costituita da un generatore di ultrasuoni, un sonotrodo e un trasduttore operante alla frequenza di 40 KHz. Lo scopo del generatore è di generare un'alta frequenza elettrica alternata che viene inviata al trasduttore. Il trasduttore è il componente che ha il compito di trasformare l'energia elettrica in onde alternate meccaniche sinusoidali pulsanti amplificate di tipo vibrazionale: queste onde soniche sono appunto gli ultrasuoni. Per fare questo, all'interno del trasduttore, è presente un materiale con proprietà piezoelettriche. La piezoelettricità è la proprietà di alcuni cristalli di espandersi o contrarsi quando si applica una differenza di potenziale tra le facce del cristallo. L'apparecchiatura ad ultrasuoni è stata progettata *ad hoc* per essere accoppiata al trattamento con CO_2 ad alte pressioni ed il sonotrodo posizionato all'interno del reattore in zaffiro; inoltre il sistema è stato dimensionato per assicurare un'ampiezza, definita come l'ampiezza delle oscillazioni, costante alla punta del sonotrodo e per poter variare la potenza in uscita in funzione della pressione di esercizio dell'impianto.

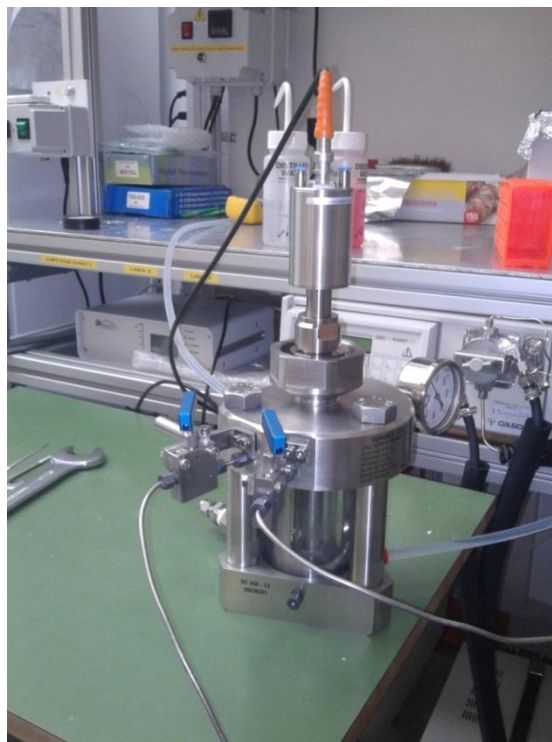


Figura 2.3. Reattore in zaffiro con sonotrodo

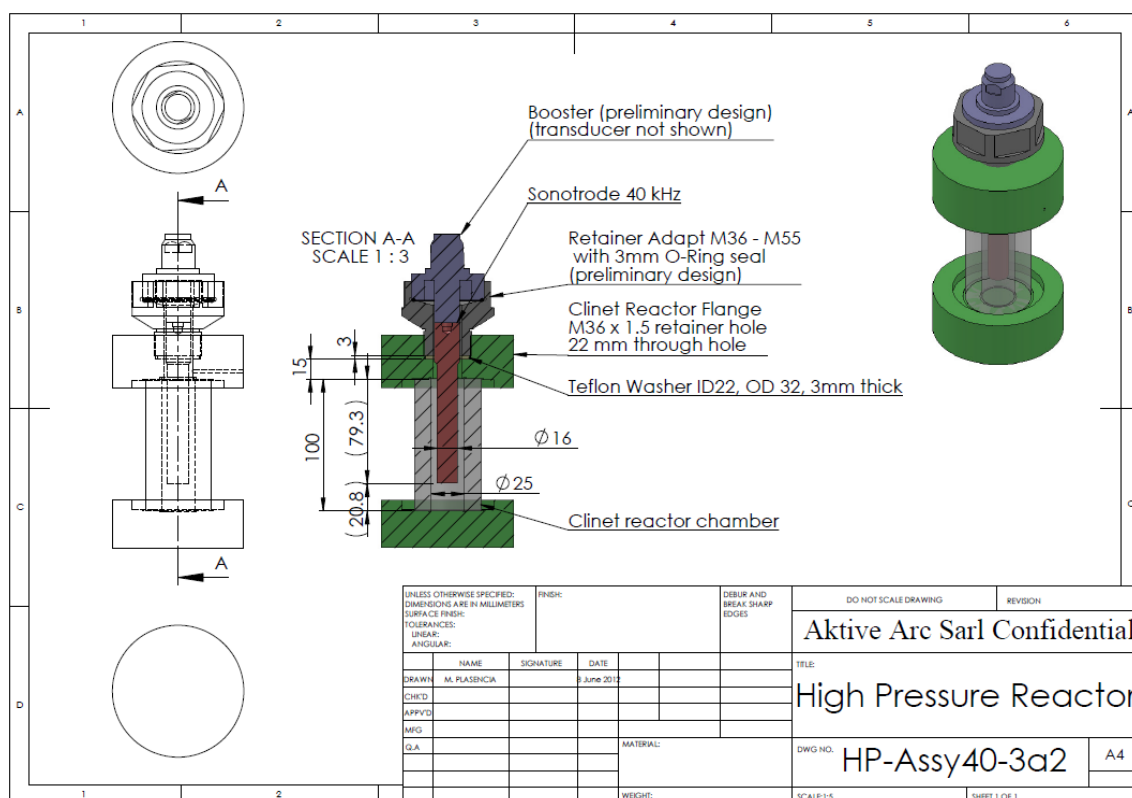


Figura 2.4. Disegno CAD del reattore con trasduttore e sistema di montaggio

Quando il sonotrodo è immerso in diverse sostanze, come soluzioni acquose o aria, oppure usato in diverse condizioni di pressione, il carico applicato sul sonotrodo aumenta, causando una variazione nella potenza in uscita tale da mantenere costante l'ampiezza vibrazionale. La potenza massima erogabile dal sistema è di 400 W.

Dal pannello di controllo del generatore di ultrasuoni è possibile controllare e regolare: l'ampiezza del segnale che ha un effetto diretto sulla potenza in uscita, il tempo di trattamento o l'energia da erogare.

2.3 Collaudo e test di funzionamento dell'impianto

Prima di condurre le prove sperimentali di inattivazione sono stati effettuati dei test di collaudo per capire il funzionamento della sonda e determinare la variazione della potenza in uscita e della frequenza a diverse pressioni e quindi a diverse condizioni di carico.

Quando si opera in aria, il carico effettivo sul corpo del sonotrodo è molto basso e, conseguentemente, la potenza erogata è dell'ordine dei 15-30 W. Operando in acqua o altri liquidi il carico effettivo aumenta con l'aumentare della profondità di immersione del sonotrodo.

Per determinare la potenza erogata a diversi livelli di carico sono state condotte due tipologie di prove:

1. a pressione atmosferica con il sonotrodo in aria e poi immerso in acqua a diverse profondità
2. alla temperatura di 25°C con il sonotrodo in aria e poi immerso in 2 cm di acqua applicando pressioni crescenti di CO₂.

Il primo set di prove, riportato in Figura 2.5, ha permesso di determinare come varia la potenza al variare dell'ampiezza con il sonotrodo inizialmente in aria e progressivamente immerso in acqua. I dati raccolti mostrano che la potenza aumenta abbastanza linearmente con l'ampiezza e con il livello di immersione del sonotrodo.

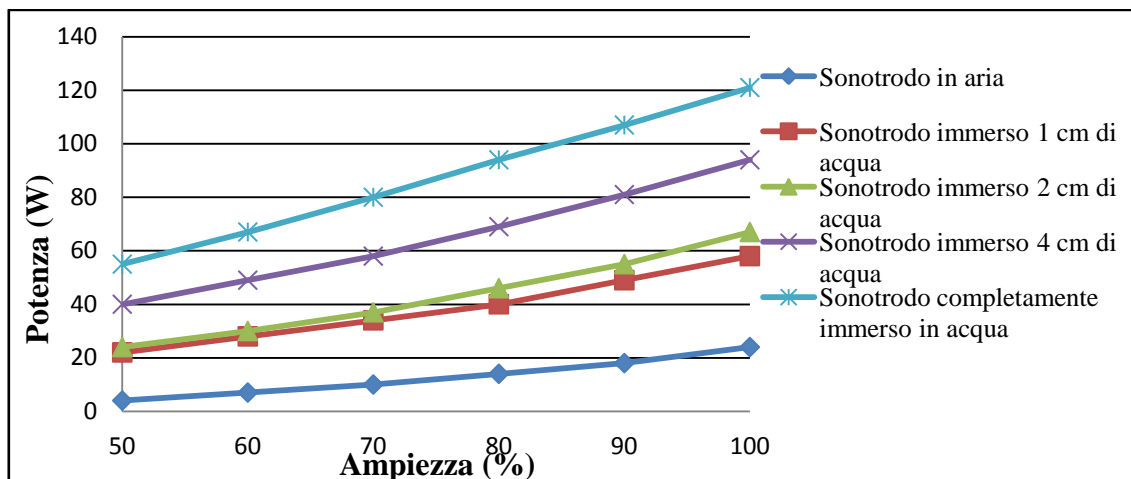


Figura 2.5. Andamento della potenza in funzione dell'ampiezza e del carico applicato al sonotrodo

In Figura 2.6 sono riportati i risultati delle prove per valutare l'andamento della potenza al variare della pressione e dell'ampiezza con il sonotrodo in aria e poi successivamente immerso in acqua.

Per le prove in liquido il reattore è stato riempito con 20 ml di acqua (corrispondente a 2 cm di immersione del sonotrodo) e pressurizzato con CO₂ a 60, 80 e 100 bar. Le stesse pressioni sono state utilizzate per le prove in aria.

I risultati hanno mostrato che a 100 bar e 25°C, quindi con CO₂ allo stato liquido, il sistema può essere utilizzato con un'ampiezza massima del 70%. Aumentando l'ampiezza la potenza erogata supera il massimo consentito ed il generatore interrompe l'alimentazione al sonotrodo.

Le prove sperimentali effettuate in liquido hanno mostrato che alle pressioni di 80 e 100 bar l'ampiezza massima utilizzabile è l'80% del fondo scala.

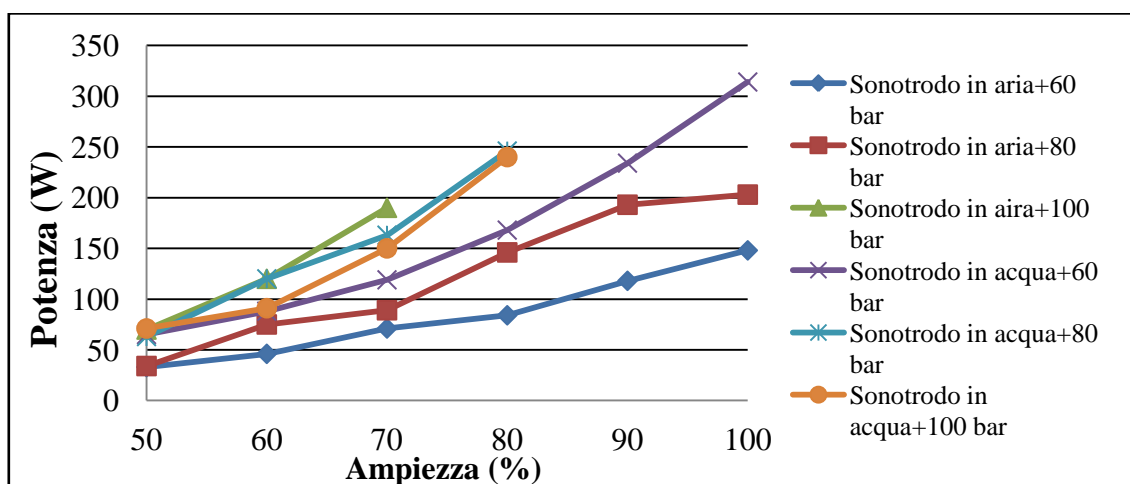


Figura 2.6. Andamento della potenza in funzione della pressione e dell'ampiezza

Le ultime prove hanno avuto come obiettivo la determinazione della frequenza effettiva di funzionamento del sonotrodo a varie condizioni di carico e di ampiezza del segnale. Le condizioni analizzate sono effettuate con il sonotrodo nelle seguenti configurazioni:

1. in aria
2. immerso in CO₂ alla pressione di 60 bar
3. immerso per 2 cm in acqua e ad una pressione di 60 bar

Tutte le prove sono state eseguite a temperatura ambiente, quindi con CO₂ allo stato liquido, ed i risultati sono riportati in Tabella 2.1.

Tabella 2.1: Andamento della frequenza con sonotrodo in aria a pressione ambiente, in aria a 60 bar e in acqua a 60 bar a diversi valori di ampiezza

Sonotrodo in aria			Sonotrodo in aria+60 bar		Sonotrodo in acqua+60 bar	
Amplitude (%)	Frequenza (KHz)	Potenza (W)	Frequenza (KHz)	Potenza (W)	Frequenza (KHz)	Potenza (W)
50	39.68	5	39.70	34	39.60	75
60	39.63	7	39.64	57	39.54	107
70	39.59	10	39.59	79	39.46	183
80	39.56	14	39.56	103	39.44	219
90	39.54	19	39.53	128		overload
100	39.52	25	39.51	150		

Gli esperimenti hanno mostrato che i valori della frequenza restano pressoché costanti al variare dell'ampiezza, sia nel caso in cui il sonotrodo è in aria a diverse pressioni, sia in liquido a 60 bar (garantendo quindi la stabilità del sistema). Per la prova a 60 bar in acqua non si è riusciti ad andare oltre l'80% di ampiezza, contrariamente a quanto mostrato in Figura 2.6, dove al 100% di ampiezza la potenza erogata è di circa 300 W. Ciò è dovuto al fatto che una piccola differenza di temperatura e quindi di densità della CO₂ cambia notevolmente il carico applicato al sonotrodo.

2.4 Matrici alimentari trattate

Gli alimenti trattati in questo lavoro di tesi sono stati il cocco e la carota, tagliati in pezzi di 2 grammi ciascuno e pronti al consumo, prodotti che rientrano nella categoria degli alimenti *ready to eat*.

Essi fanno parte dei prodotti studiati nell'ambito del progetto PRESERF dove sono stati scelti come i migliori candidati al processo di pastorizzazione con CO₂ ad alte pressioni.

La necessità di sottoporli ad un trattamento di pastorizzazione nasce dal fatto che hanno una limitata *shelf life* e sono affetti da un veloce deterioramento a causa delle contaminazioni microbiche che subiscono quando sono tagliati e lavati.

Tuttavia i risultati ottenuti applicando il trattamento con CO₂ in pressione hanno mostrato che la pastorizzazione del cocco e della carota avviene usando condizioni di processo molto spinte. Ad esempio la flora naturale del cocco è disattivata a 120 bar, 40°C e 30 minuti, oppure a 120 bar, 45°C e 15 minuti.

Altre specie microbiche come *Salmonella enterica* inoculata su cocco ed i microrganismi mesofili e lattici della carota non subiscono una disattivazione spinta pur aumentando le condizioni di pressione, temperatura e tempo di trattamento.

Il trattamento combinato di ultrasuoni e CO₂ in pressione verrà applicato quindi per studiarne l'efficienza nell'inattivazione delle specie microbiche più resistenti e garantire la pastorizzazione di cocco e carota.

2.5 Procedura operativa

Sono riassunte le procedure sperimentali adottate nella preparazione dei campioni e per lo svolgimento dei trattamenti di pastorizzazione con CO₂ in pressione, con ultrasuoni e con ultrasuoni e CO₂ in pressione combinato.

2.5.1 Preparazione dei campioni liquidi

I primi esperimenti sono stati effettuati per testare l'efficacia del trattamento combinato su soluzioni liquide di *Salmonella enterica* ed *Escherichia coli*. La coltura microbica è stata ottenuta inoculando una singola colonia di *S. enterica* (ATCC1402) o di *E. coli* (ATCC25922) in un mezzo di coltura liquido (L. B. broth) ed incubando la soluzione per tutta la notte in un incubatore agitato a 37°C. Per le prove sperimentali, 10 ml di coltura sono stati centrifugati per 10 minuti a 6000 rpm, e, dopo aver eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 100 ml di una soluzione tampone fosfato sterile, ottenendo una sospensione microbica con una concentrazione iniziale di cellule pari a circa 10⁸ ufc/ml. Per la determinazione delle cinetiche di abbattimento 20 ml di campione sono caricati nel reattore e sottoposti al trattamento.

2.5.2 Preparazione dei campioni solidi

Gli alimenti da trattare sono stati acquistati nei mercati locali, prima di essere trattati sono stati lavati e tagliati in pezzi del peso di 2 grammi ciascuno.

Per la determinazione della flora naturale il campione, una volta pesato, è stato caricato nel reattore e trattato.

Nel caso dei trattamenti per la determinazione delle cinetiche di abbattimento di *S. enterica* e di *E. coli* inoculati su substrato solido sono state necessarie alcune operazioni preliminari.

Anche in questo caso una singola colonia di *S. enterica* (ATCC1402) o di *E. coli* (ATCC25922) è stata inoculata in un mezzo di coltura liquido (L. B. broth) e fatta crescere per tutta la notte in un incubatore agitato a 37°C. Per le prove sperimentali, 10 ml di coltura sono stati centrifugati per 10 minuti a 6000 rpm e, dopo aver eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 5 ml di soluzione tampone sterile.

Successivamente 50 µl di soluzione microbica sono inoculati sulla superficie del campione che viene poi lasciato asciugare per un'ora sotto cappa a flusso laminare.

2.5.3 Procedura sperimentale

La procedura standard utilizzata nelle prove di pastorizzazione è la seguente:

- operazioni preliminari. Comprende accensione e regolazione della temperatura del criostato ed impostazione dei parametri della pompa;
- pulizia dell'impianto. Non potendo autoclavare il reattore la pulizia è effettuata con etanolo e facendo fluire CO₂ a pressione bombola attraverso le tubazioni dell'impianto;
- carico del reattore. Il campione viene posto nel reattore, si regola la temperatura di prova del bagno termostato e si attende che il reattore raggiunga la temperatura impostata;
- pressurizzazione dell'impianto. Quando viene raggiunta la temperatura di prova si apre la valvola di alimentazione del reattore e si accende la pompa fino al raggiungimento della pressione di prova. Nel caso la pressione cali nel corso della prova la pompa si accende e spegne automaticamente per mantenere la pressione costante;
- depressurizzazione dell'impianto. Raggiunto il tempo di trattamento stabilito, si chiude la valvola di alimentazione del reattore, si spegne la pompa e si apre la valvola di scarico per decomprimere il reattore. Il campione viene prelevato dal reattore in condizioni sterili e messo in una falcon per le successive analisi microbiologiche.

Per le prove di pastorizzazione con trattamento combinato CO₂ ed ultrasuoni è necessario impostare dal menu del generatore di ultrasuoni il tempo di trattamento e l'ampiezza e far partire gli ultrasuoni quando si raggiunge la pressione di trattamento.

Nel caso del trattamento solo con ultrasuoni, una volta raggiunta la temperatura operativa, si accende il generatore di ultrasuoni il quale si spegnerà automaticamente alla fine del tempo di trattamento.

I trattamenti hanno permesso la determinazione delle cinetiche di inattivazione, in funzione del tempo di trattamento a varie condizioni di pressione e temperatura, della flora naturale del cocco e della carota e di *Salmonella enterica* ed *Escherichia coli* inoculate rispettivamente sul cocco e sulla carota.

Le condizioni di trattamento applicate sono state:

- 120 bar, 22 e 35°C, in funzione dei tempi di trattamento da 0 a 30 min per la flora naturale del cocco e della carota
- 100 e 120 bar, 35, 40 e 50°C in funzione dei tempi di trattamento da 0 a 30 min per *Salmonella enterica* inoculata sul cocco
- 60, 80 e 100 bar, 22 e 35°C in funzione dei tempi di trattamento da 0 a 30 min per *Escherichia coli* inoculata sulla carota.

L'efficacia dei trattamenti è stata verificata utilizzando il metodo di conta su piastra in cui è stato valutato il numero di microrganismi (ufc, unità formanti colonie) nei campioni trattati e non trattati.

2.6 Microrganismi e loro determinazione

I microrganismi presenti sugli alimenti, sia da inoculo sia la flora naturale, sono isolati attraverso l'omogeneizzazione del campione con una soluzione tampone fosfato sterile alla frequenza di 35 Hz per 2 minuti.

Questa agitazione permette il rilascio dei microrganismi dal campione alla soluzione e la possibilità di determinare la carica microbica del campione prima e dopo i trattamenti con analisi microbiologiche di conta su piastra. Le analisi sono effettuate, a seconda del microrganismo cercato, per inclusione o spatolamento, utilizzando piastre di terreno selettivo ed analizzando 100 µl del campione opportunamente diluito seguendo diluizioni seriali e successivamente incubato alla temperatura e per il tempo necessario alla crescita di ciascun microrganismo.

2.6.1 Carica microbica totale

La determinazione della carica microbica mesofila totale del cocco e della carota è stata effettuata utilizzando il PCA (Plate Count Agar), un terreno non selettivo che permette lo sviluppo di microrganismi aerobi, anaerobi facoltativi ed eterofili. Il terreno è ottenuto sciogliendo 23.5 grammi di polvere in 1 litro di acqua distillata, la soluzione è scaldata per ottenere la completa dissoluzione della polvere ed è successivamente autoclavata a 121°C per 15 minuti.

Le piastre sono ottenute per inclusione e dopo aver seminato il campione sono incubate per 48 ore a 30°C.

2.6.2 *Escherichia coli* e coliformi totali

Il terreno utilizzato per la determinazione dei coliformi totali è il Chromatic Coli/Coliform Agar. Il Tergitol-7 contenuto in questo terreno inibisce la crescita dei microrganismi Gram positivi e consente la crescita dei coliformi che sono microrganismi Gram negativi.

Il terreno è ottenuto sciogliendo 39.7 grammi di polvere in 1 litro di acqua distillata, e la sospensione così ottenuta deve essere portata a ebollizione per 5 minuti, raffreddata fino alla temperatura di 45°C e poi versata in piastre Petri.

Le piastre sono ottenute spatolando 100 µl del campione ed incubandole per 48 ore a 31°C per la determinazione dei coliformi totali presenti naturalmente sul campione e 24 ore a 37°C per la determinazione di *E. coli* inoculato sul campione.

2.6.3 Lattobacilli

Per la determinazione dei lattobacilli si è utilizzato l'M.R.S. Agar. Questo terreno è preparato sciogliendo 67.3 grammi di polvere in 1 litro di acqua distillata a cui va aggiunto come supplemento 1 ml di Tween 80; la soluzione è scaldata per ottenere la completa dissoluzione della polvere e poi autoclavata a 121°C per 5 minuti. Le piastre sono ottenute per inclusione ed incubate per 24 ore a 37°C.

2.6.4 Muffe e lieviti

La determinazione di muffe e lieviti è stata effettuata utilizzando Yeast Glucose Cloramphenicol Agar in accordo con la normativa ISO 7954:1987. Il terreno è ottenuto

sciogliendo 41.3 grammi di polvere in 1 litro di acqua distillata. Le piastre sono ottenute per inclusione ed incubate a 25°C per 4 giorni in assenza di luce.

2.6.5 *Salmonella enterica*

Il terreno utilizzato per la crescita di *S. enterica* è Chromatic Salmonella Agar, ottenuto sciogliendo 34.7 grammi di polvere in 1 litro di acqua distillata ed aggiungendo 3 ml di Chromatic Salmonella Supplement e 3 ml di TWEEN 80 Supplement. La sospensione così preparata è portata ad ebollizione per 5 minuti, successivamente raffreddata fino alla temperatura di 45°C ed infine versata in piastre Petri. Le piastre sono ottenute spatolando 100 µl del campione ed incubando a 37°C per 24 ore.

Capitolo 3

Risultati sperimentali preliminari su substrato liquido

In questo capitolo sono descritte le prime prove sperimentali condotte allo scopo di verificare l'effetto sinergico del processo che utilizza simultaneamente CO₂ e ultrasuoni, come descritto da Ortuno et al. 2012 per il trattamento di *E. coli*.

3.1 Cinetiche di disattivazione di *Escherichia coli*

Le cinetiche di abbattimento di *E. coli* sono state ottenute a 100 bar alla temperatura di 35°C valutando l'effetto del tempo di trattamento (variabile da 1 a 7 minuti) sul grado di inattivazione. Tutte le prove sono state eseguite in doppio e i dati riportati sono la media dei 2 valori ottenuti.

I dati di abbattimento sono espressi come $\text{Log}(CFU/CFU_0)$ dove *CFU* ed *CFU₀*, espressi in ufc/ml, rappresentano rispettivamente il numero di microrganismi per millilitro ai vari tempi di trattamento ed il numero di microrganismi per millilitro nel campione non trattato.

La potenza media applicata durante il trattamento con ultrasuoni (HPU) alla temperatura di 35°C è stata pari a 32W±1W, mentre durante il trattamento combinato la potenza erogata è stata di 51W±8W. Durante i trattamenti in pressione si è notata una maggior oscillazione nella potenza in uscita dal generatore; questo è legato al fatto che un innalzamento di pressione anche di soli 1-2 bar, dovuto ad un leggero aumento della temperatura in seguito all'energia erogata dal trattamento con ultrasuoni, genera un aumento del carico applicato sul sonotrodo e quindi della potenza in uscita.

Per il trattamento con CO₂ l'agitazione del sistema è garantita da un agitatore magnetico con velocità di rotazione di 200 rpm.

In Figura 3.1 sono rappresentate le cinetiche di inattivazione per il trattamento con ultrasuoni, con CO₂ e per il trattamento combinato ultrasuoni e CO₂ a 35°C in funzione dei tempi di trattamento.

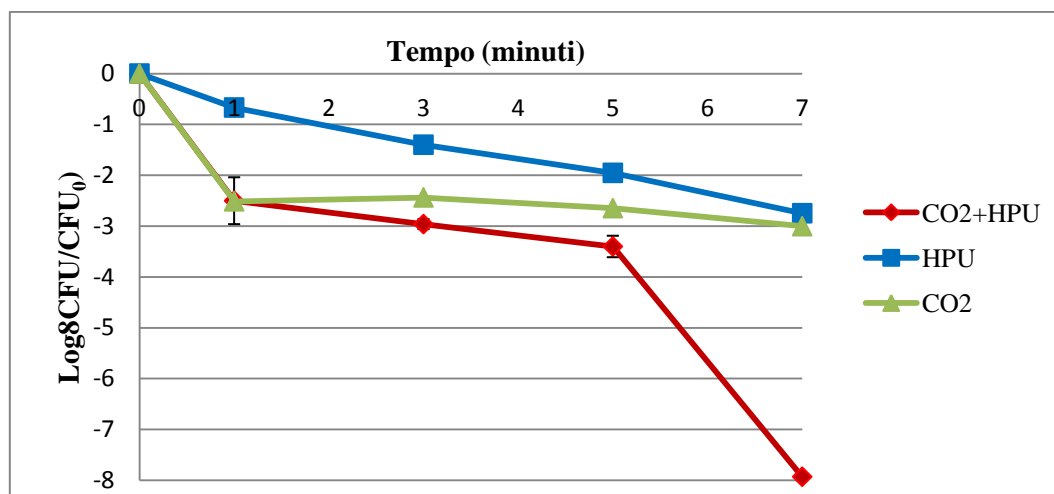


Figura 3.1: Cinetica di disattivazione di *E. coli* a seguito di un trattamento con CO₂ (100 bar, 35°C), CO₂ + HPU (100 bar, 35°C, 51 W) e HPU (35°C, 32 W)

I risultati sperimentali mostrano come il trattamento solo con ultrasuoni e solo con CO₂ siano scarsamente efficaci nell'abbattere la carica microbica. In particolare il trattamento con CO₂ induce durante il primo minuto di trattamento un grado di inattivazione pari a circa 2.5 log, in seguito non porta a nessun ulteriore abbattimento: dato che come si vede in Figura 3.1, la cinetica presenta un plateau. Il trattamento combinato, al contrario, in 7 minuti permette la completa disattivazione della carica microbica.

Durante la prova in pressione è stato monitorato l'andamento della temperatura, come riportato in Figura 3.2, per verificare che la disattivazione non fosse imputabile ad un eccessivo riscaldamento del campione.

Considerando che l'aumento di temperatura è contenuto in circa 2°C, si conclude che il maggior abbattimento ottenuto con il trattamento combinato non è causato dall'aumento di temperatura del campione.

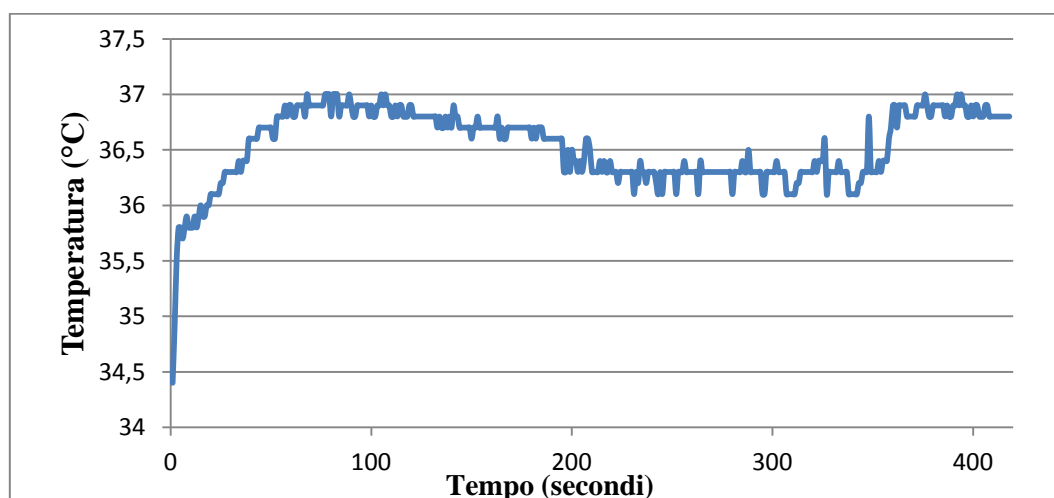


Figura 3.2: andamento della temperatura del campione liquido sottoposto a trattamento con ultrasuoni e CO₂ alla temperatura di 35°C e pressione di 100 bar.

Il grado di disattivazione ottenuto dopo il trattamento con CO₂ supercritica non ha dato risultati confrontabili con quelli riportati da Ortuno et al. 2012: come si vede in Figura 3.3, nel loro caso è stato registrato un abbattimento di circa un'unità logaritmica in 30 minuti di trattamento, nel caso invece del trattamento combinato CO₂ e ultrasuoni ottengono la disattivazione completa, di 8 unità logaritmiche, in 2 minuti di trattamento.

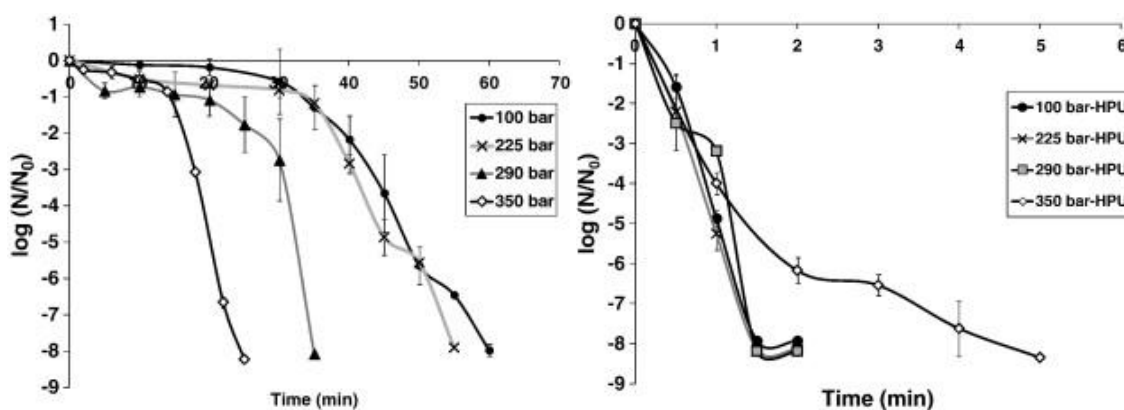


Figura 3.3. Cinetiche di disattivazione di *E. coli* DH1 in LB medium alla temperatura di 36°C, trattamento in pressione e trattamento combinato CO₂ e ultrasuoni (Ortuno et al. 2012)

La diversa cinetica di abbattimento potrebbe essere spiegata considerando il differente mezzo in cui sono sospese le cellule, LB medium nel loro caso e una soluzione tampone fosfato in queste prove. Altri fattori che influiscono sulla cinetica sono il tipo di impianto, l'agitazione del sistema (per i trattamenti solo con CO₂) e le diverse quantità di substrato trattato.

Pur essendoci differenze nelle cinetiche di abbattimento, si conclude che l'effetto sinergico del trattamento con CO₂ e ultrasuoni è stato verificato ed è dello stesso ordine di grandezza di quello ottenuto da Ortuno et al. 2012.

3.2 Cinetiche di disattivazione di *Salmonella enterica*

Dopo aver verificato l'effetto sinergico di CO₂ e ultrasuoni su substrato liquido inoculato con *E. coli*, un microrganismo Gram negativo, è stato considerato un secondo microrganismo test, *Salmonella enterica* che è Gram positivo, e manifesta una specifica resistenza al trattamento con CO₂.

Le cinetiche di abbattimento di *S. enterica* sono state ottenute a 100 bar valutando l'effetto della temperatura (a 24 e 35°C) e del tempo di trattamento (da 1 a 15 minuti) sul grado di inattivazione. Anche in questo caso le prove sono state eseguite in doppio e i dati riportati sono la media dei 2 valori ottenuti.

Il primo set di prove, riportato in Figura 3.4, è stato condotto alla temperatura di 24°C. I dati di abbattimento sono espressi come $\text{Log}(\text{CFU}/\text{CFU}_0)$.

La potenza applicata durante il trattamento con ultrasuoni alla temperatura di 25°C è stata pari a $36\text{W} \pm 1\text{W}$, durante il trattamento combinato la potenza erogata è stata di $65\text{W} \pm 10\text{W}$.

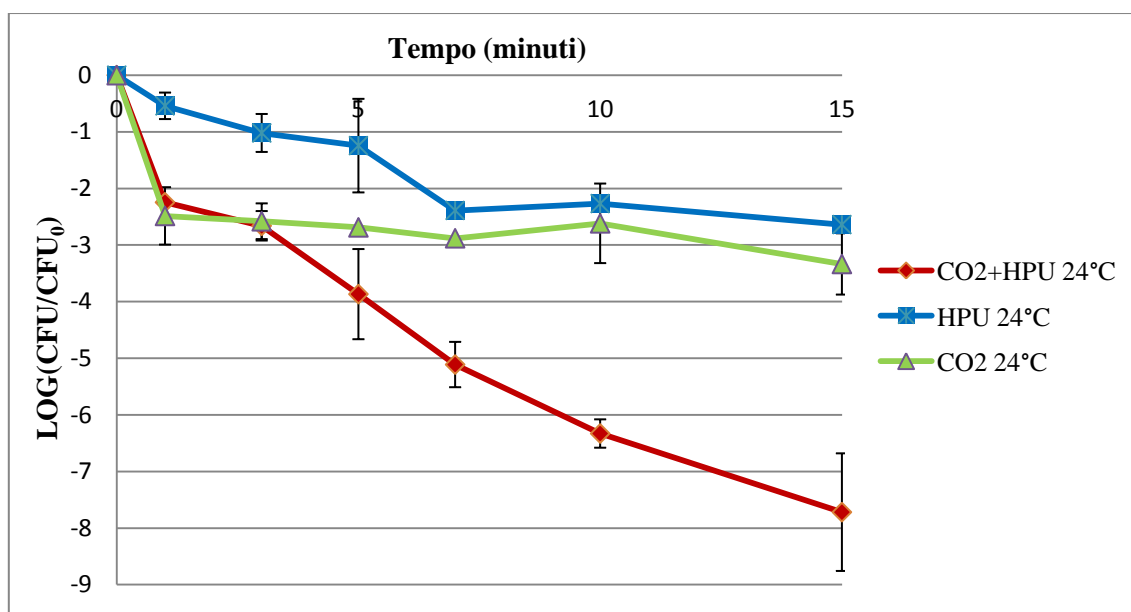


Figura 3.4: Cinetica di disattivazione di *S. enterica* a seguito di un trattamento con CO_2 (100 bar, 24°C), CO_2 + HPU (100 bar, 24°C, 51 W) e HPU (24°C, 32 W), per la prova con CO_2 + HPU si ha disattivazione completa del campione in 15 minuti

Anche per il trattamento a 24°C è stato registrato l'andamento della temperatura durante la prova verificando un innalzamento massimo di 2°C, il che consente di escludere l'eccessivo riscaldamento del campione come la causa della disattivazione

Il secondo set di prove, Figura 3.5, è stato condotto alla pressione di 100 bar e alla temperatura di 35°C quindi con CO_2 in condizioni supercritiche.

Per il trattamento solo con HPU alla temperatura di 35°C la potenza erogata è stata di $32\text{W} \pm 1\text{W}$, mentre per il trattamento in pressione la potenza erogata dal generatore è stata di $51\text{W} \pm 8\text{W}$.

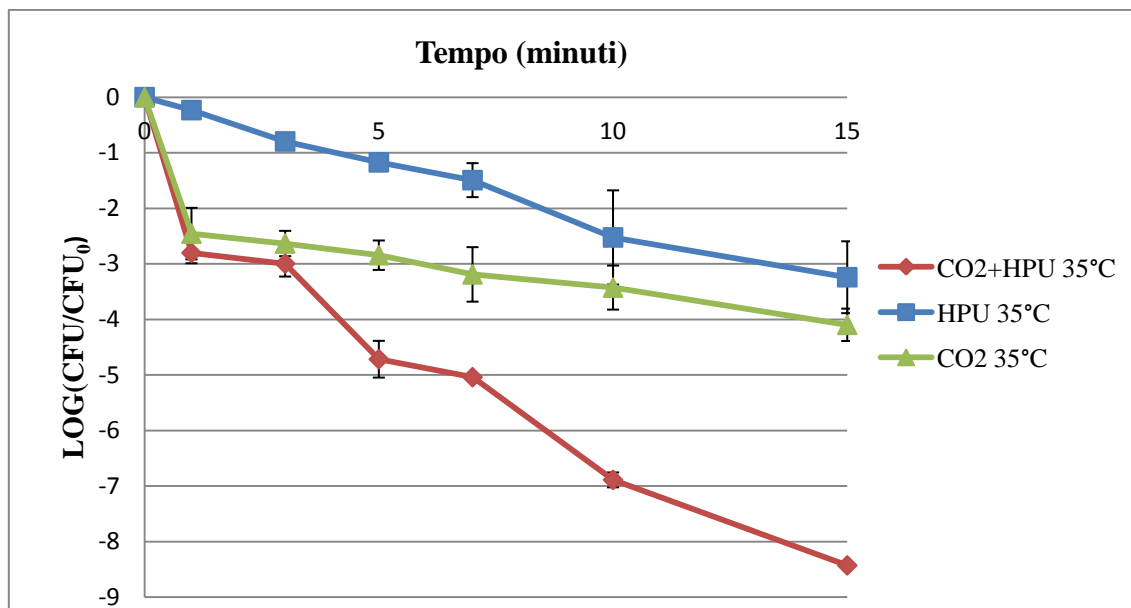


Figura 3.5. Cinetica di disattivazione di *S. enterica* CO₂ a seguito di un trattamento con CO₂ (100 bar, 35°C), CO₂ + HPU (100 bar, 35°C, 51 W) e HPU (35°C, 32 W), per la prova con CO₂ + HPU si ha disattivazione completa del campione in 15 minuti

I risultati sperimentali mostrano come i trattamenti solo con ultrasuoni e solo con CO₂ siano scarsamente efficaci nell'abbattere la carica microbica. In particolare il trattamento con CO₂ dopo un minuto di trattamento induce una disattivazione pari a circa 2.5 log e in seguito la velocità di disattivazione diminuisce notevolmente portando alla disattivazione di solo un'unità logaritmica nei successivi 14 minuti di trattamento.

Al contrario, il trattamento combinato permette la completa disattivazione della carica microbica in 15 minuti; si osserva inoltre che durante il primo minuto di trattamento si ottiene una disattivazione pari a quella ottenuta nel trattamento con sola CO₂. In seguito, però, a differenza del trattamento con CO₂, la velocità di disattivazione si mantiene elevata.

È noto che gli ultrasuoni ad alta potenza generano fenomeni di cavitazione nel liquido che consistono nella formazione, crescita e implosione di piccole bolle di gas. Essi sono la causa della rottura o del danneggiamento della parete cellulare, il cui effetto è un aumento della diffusione dei componenti cellulari verso l'esterno della cellula.

Il fatto che le cellule mostrino una notevole resistenza al trattamento solo con CO₂, ma molto inferiore al trattamento combinato, indica che l'effetto dato dai fenomeni di cavitazione gioca un ruolo importante nella diffusione della CO₂ all'interno della cellula e nell'estrazione dei componenti intracellulari (Ortuno et al., 2012).

Probabilmente l'effetto degli ultrasuoni (indipendente dalla temperatura) di danneggiamento a livello di membrana e di aumento della velocità di diffusione della CO₂ nel mezzo liquido, comporta un aumento della velocità di abbattimento.

Confrontando le curve di inattivazione alle due diverse temperature non si osserva una differenza apprezzabile. Con sola CO₂ a 35°C si ha l'abbattimento di un'unità logaritmica in

più rispetto al trattamento a 24°C, questo dipende dal fatto che all'aumentare della temperatura aumenta la fluidità della membrana e si ha una maggiore diffusione del gas in quanto si trova allo stato supercritico (Gonzales et al. 2007).

Capitolo 4

Risultati sperimentali su substrato solido

In questo capitolo sono descritte le prove sperimentali effettuate per valutare le condizioni ottimali di pastorizzazione per la carota e il cocco trattati con ultrasuoni e CO₂ ad alte pressioni. Sono state determinate le cinetiche di disattivazione della flora naturale presente sui campioni, microrganismi mesofili, batteri lattici, muffe e lieviti e coliformi totali, e di *S. enterica* e *E. coli* inoculati rispettivamente su cocco e carota.

4.1 Cinetiche di disattivazione di *Salmonella enterica* su cocco

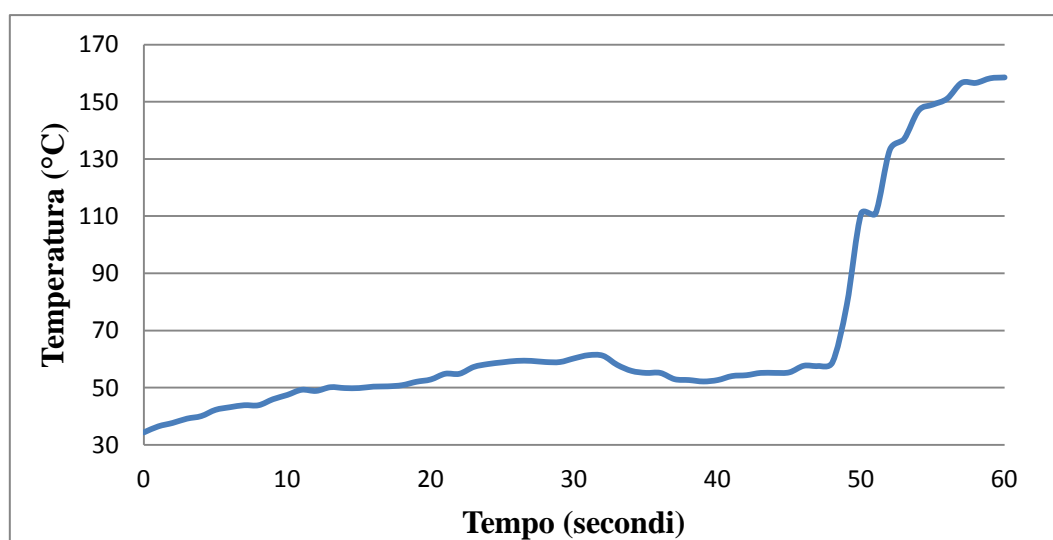
Le cinetiche di abbattimento di *S. enterica* sono state ottenute a 100 bar e alla temperatura di 35°C variando il tempo di trattamento da 0 a 20 minuti ed a 120 bar valutando l'effetto a temperatura di 40°C e 50°C variando il tempo di trattamento da 0 a 30 minuti.

Il primo problema da affrontare è stato il set up delle condizioni ottimali di trattamento con ultrasuoni in modo tale da evitare il deterioramento del campione a causa del notevole aumento di temperatura dovuto all'energia trasferita dagli ultrasuoni. Con un'ampiezza pari al 50%, utilizzata per le prove con substrati liquidi, la potenza media erogata a 100 bar è dell'ordine dei 51W±8W. In queste condizioni di trattamento le prime prove, riportate in Tabella 4.1, hanno avuto lo scopo di determinare se un breve tempo di trattamento combinato avesse effetti sulla carica microbica e sull'aspetto visivo del campione. Partendo da 5 secondi fino ad 1 minuto di trattamento non si sono osservati effetti significativi di riduzione della carica microbica inoculata.

Tabella 4.1. *Stato del campione a vari tempi di trattamento*

Tempo HPU+CO2 (secondi)	Energia	Condizioni campione	Abbattimento (<i>S. enterica</i>)
5	483 J	Buone condizioni	0.5 log
30	3398 J	Leggero annerimento	1.1 log
60	3745 J	Campione bruciato	2 log

Inoltre, per tempi di trattamento superiori ai 30 secondi si è notato un evidente annerimento del campione a causa del notevole aumento di temperatura, come mostrato in Figura 4.1, dove è stato riportato il profilo di temperatura del campione in funzione del tempo di trattamento.

**Figura 4.1.** *Andamento della temperatura nel campione, 1 minuto di trattamento combinato con ampiezza al 50% (51 W)*

Data l'impossibilità di utilizzare tempi superiori ai 30 secondi, pena il deterioramento del campione, si è pensato di effettuare un trattamento combinato ultrasuoni e CO₂ in pressione, a cicli di 30 secondi, seguiti da 1 minuto di trattamento con solo CO₂ in pressione.

I tempi totali del trattamento sono stati 3, 5, e 7 minuti. Come mostrato in Tabella 4.2, anche in questo caso si è osservato un imbrunimento del campione a causa delle elevate temperature indotte dagli ultrasuoni.

Tabella 4.2. Condizioni del campione dopo trattamento con cicli di 30 secondi HPU+CO₂ seguiti da 1 minuto solo CO₂

Tempo totale trattamento (minuti)	Tempo totale HPU (minuti)	Energia	Condizioni campione
3	1	2559 J	Leggero annerimento
5	2	4819 J	Annerito
7	2.5	5945 J	Campione bruciato

Anche riducendo il tempo del trattamento combinato a 15 secondi con un intervallo di tempo di 1 minuto tra un trattamento ed il successivo per permettere al campione di raffreddarsi, i risultati sono stati negativi a causa del deterioramento del campione.

Non ottenendo risultati soddisfacenti si è deciso di ridurre il guadagno elettronico del generatore in modo tale da erogare una potenza minore e diminuire l'ampiezza al 30% con una potenza in uscita di circa 8 W alla pressione di 100 bar e alla temperatura di 35°C.

Con questi parametri si è osservato che la temperatura del campione non supera i 52°C effettuando un trattamento combinato di 2 minuti, come mostrato in Figura 4.2.

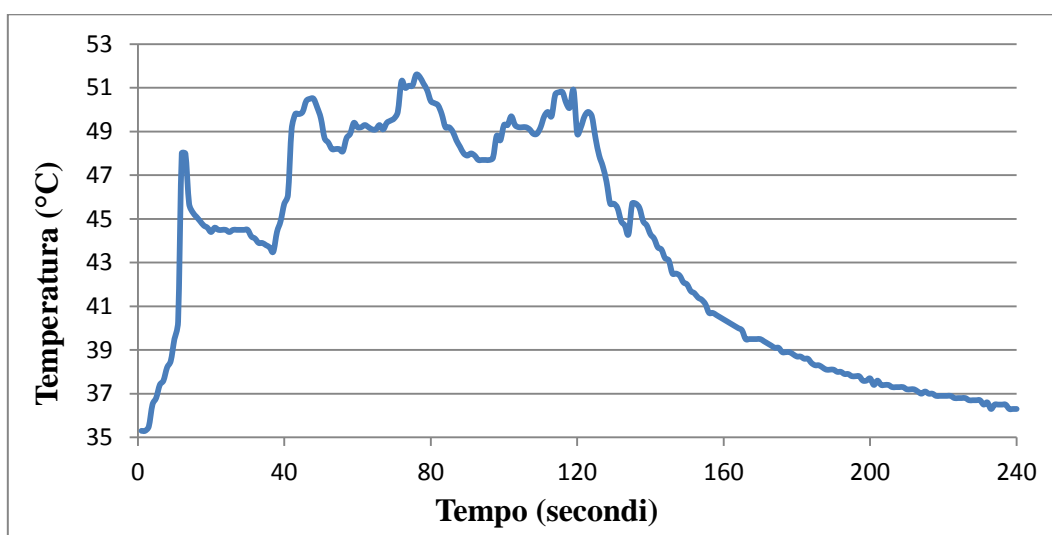


Figura 4.2. Andamento della temperatura nel campione, 2 minuti di trattamento combinato e 2 minuti solo con CO₂ con ampiezza al 30% (potenza 8 W) e temperatura di 35°C

In base a questi risultati si è deciso, quindi, di sottoporre il campione ad un trattamento costituito da cicli di 2 minuti di ultrasuoni e CO₂ in pressione seguiti da 2 minuti di trattamento con CO₂ in pressione, in cui si è osservato un raffreddamento del campione. In questo modo, con un tempo di trattamento totale di 10 minuti, si ottiene un abbattimento di circa 3 unità logaritmiche partendo da un campione con una carica iniziale di 8 unità logaritmiche.

In Figura 4.3 sono riportate le cinetiche di disattivazione di *Salmonella enterica* inoculata su cocco, trattata con ultrasuoni a 35°C, CO₂ a 100 bar e 35°C, ultrasuoni e CO₂ a 8 W, 100 bar e 35°C in funzione dei tempi di trattamento da 5 a 20 minuti.

I risultati mostrano l'efficacia del trattamento combinato: dopo 20 minuti è stata misurata una disattivazione di 2.5 log in più rispetto al trattamento con la sola CO₂ in pressione.

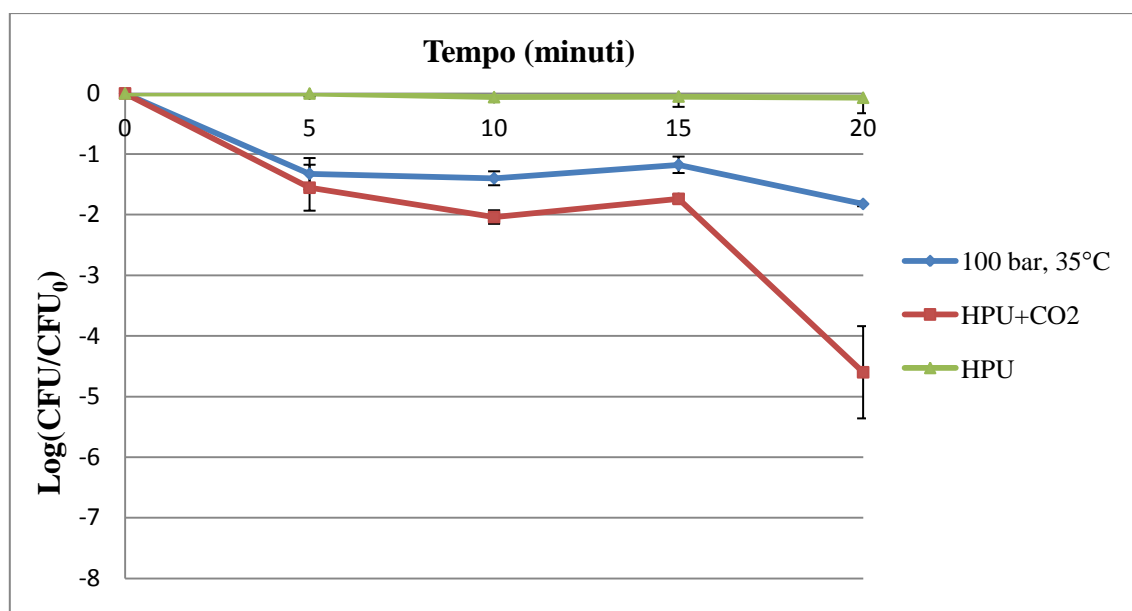


Figura 4.3. Cinetica di disattivazione di *S. enterica* inoculata su cocco a seguito di un trattamento con CO₂ (100 bar, 35°C), CO₂+HPU (100 bar, 35°C, 8W) e HPU (8 W, 35°C)

Nel secondo set di prove la temperatura di trattamento è stata alzata a 40°C e 50°C. La pressione a 120 bar ed i tempi di trattamento sono stati variati fino a 30 minuti, valutando l'andamento della temperatura durante il trattamento. Per le prove a 40°C, Figura 4.4, durante il trattamento combinato il campione raggiunge una temperatura massima di 51°C, mentre a 50°C, Figura 4.5, il campione raggiunge una temperatura di 70°C.

Si noti che poiché il carico applicato al sonotrodo varia al variare delle condizioni di pressione e temperatura è stato necessario effettuare delle prove preliminari per definire il valore dell'ampiezza da applicare, in modo da erogare una potenza costante alle diverse condizioni di processo.

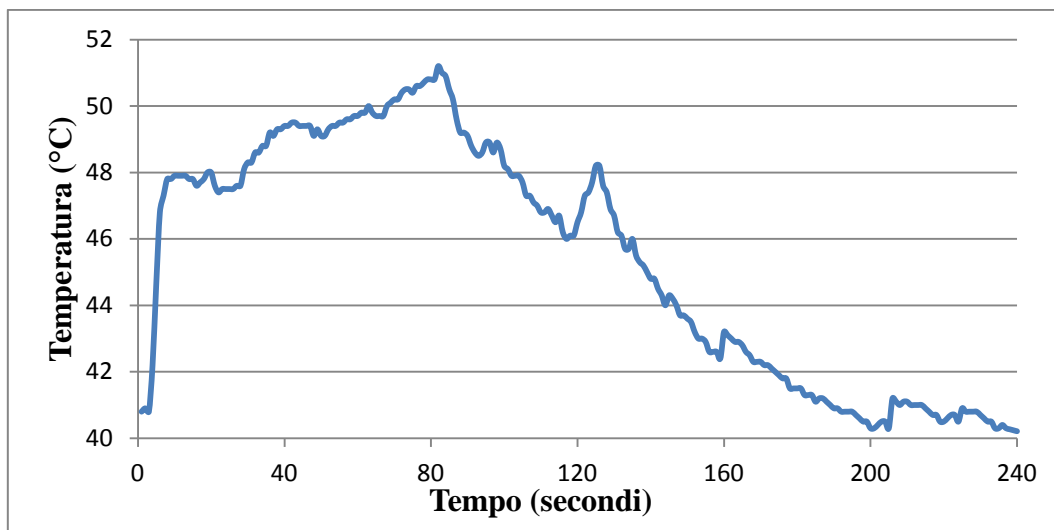


Figura 4.4. Andamento della temperatura nel campione, 2 minuti di trattamento combinato e 2 minuti a 120 bar con CO_2 e temperatura di trattamento di 40°C

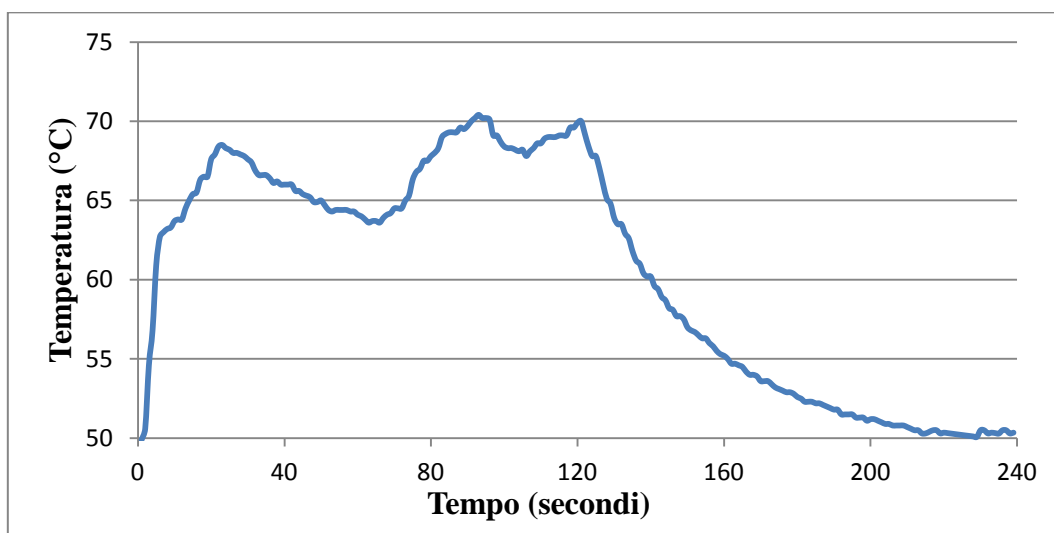


Figura 4.5. Andamento della temperatura nel campione, 2 minuti di trattamento combinato e 2 minuti a 120 bar con CO_2 e temperatura di trattamento di 50°C

In Figura 4.6 sono riportate le cinetiche di abbattimento di *S. enterica* ottenute alle temperature di 40°C e 50°C alla pressione di 120 bar.

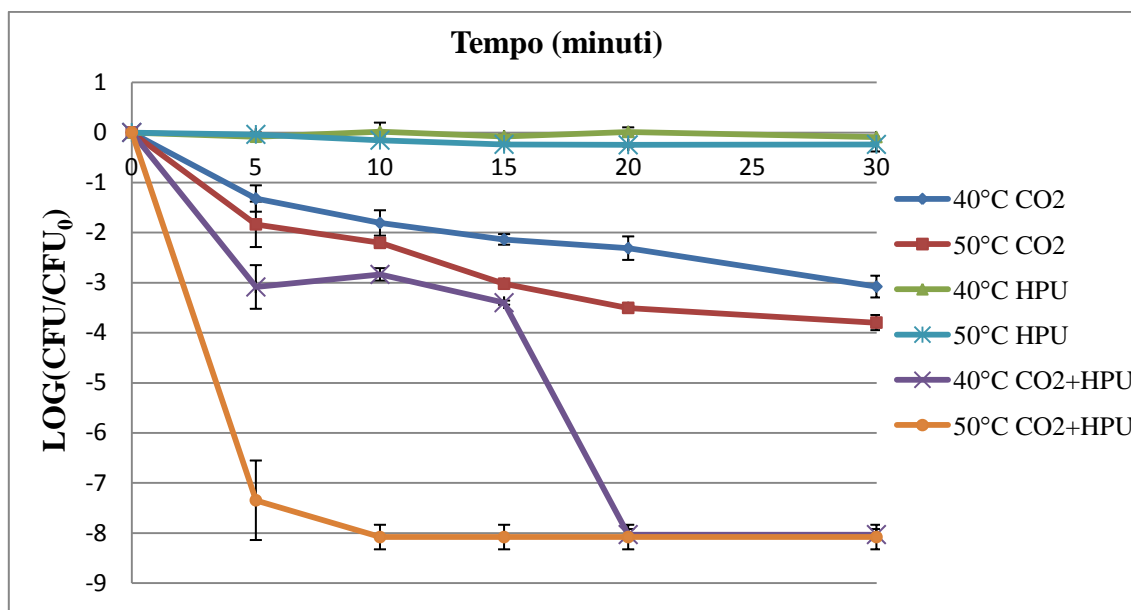


Figura 4.6. Cinetica di disattivazione di *S. enterica* inoculata su cocco a seguito di un trattamento con CO₂ (120 bar, 40°C e 50°C), CO₂+HPU (120 bar, 40°C e 50°C) e HPU (8 W 40°C e 50°C). I punti a 10 minuti per il trattamento con CO₂ + HPU a 50°C e a 20 minuti per quello a 40°C indicano una disattivazione completa della carica microbica inoculata sul campione.

I grafici mostrano che il trattamento con ultrasuoni in aria a 40°C e 50°C non ha nessun effetto sulla disattivazione di *S. enterica*, mentre il trattamento con la sola CO₂ a 120 bar, 40°C e 50°C induce una disattivazione di circa 4 log. Il trattamento combinato, invece, permette di ottenere un abbattimento completo, o comunque al di sotto del limite di rilevabilità del metodo di conta su piastra (calcolato pari a 30 ufc/g), pari ad 8 unità logaritmiche in un tempo di 20 minuti a 40°C e in 10 minuti a 50°C.

Per essere sicuri che l'abbattimento completo osservato non sia stato influenzato dal limite di rilevabilità del metodo di conta su piastra, i campioni sottoposti al trattamento combinato per 10 minuti a 120 bar, 50°C sono stati centrifugati a 9000 giri per 10 minuti, è stato eliminato il surnatante ed il pellet ottenuto è stato risospeso in 300 µl di soluzione tampone fosfato sterile. Successivamente è stato tutto piastrato in modo da determinare la carica totale presente nel campione. Anche in seguito a questa analisi, nessuna colonia di *S. enterica* è stata rilevata in piastra.

4.2 Cinetiche di disattivazione della flora naturale del cocco

Le cinetiche di disattivazione della flora naturale del cocco sono state ottenute a 120 bar e alle temperature di 22°C e 35°C valutando l'effetto del tempo di trattamento variabile da 0 a 30 minuti.

La temperatura del campione, riportata in Figura 4.7 e 4.8, aumenta di circa 13°C per il trattamento a 22°C e di circa 15°C per quello a 35°C nei primi due minuti di trattamento, per poi tornare alla temperatura iniziale nei successivi 2 minuti.

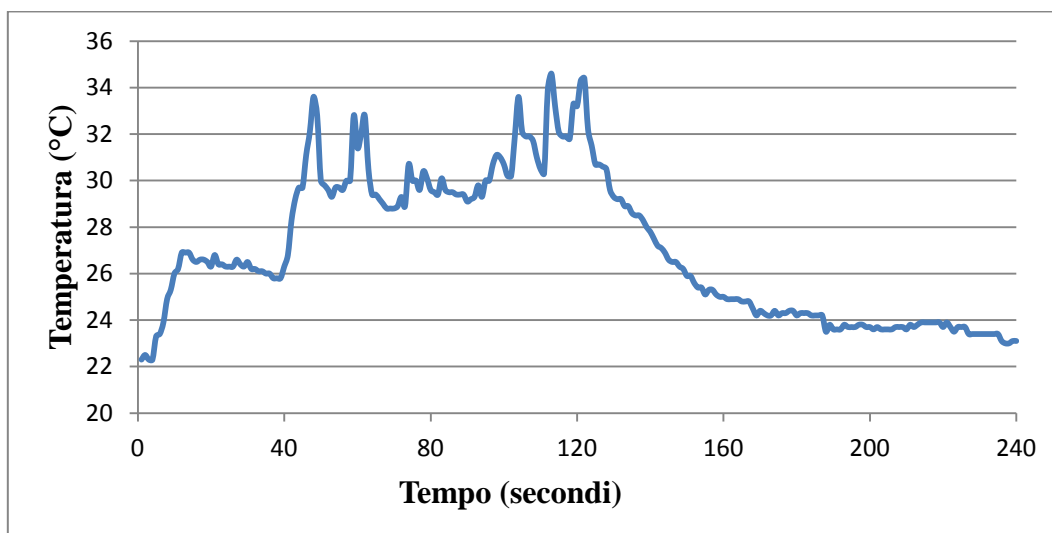


Figura 4.7. Andamento della temperatura nel campione, 2 minuti di trattamento combinato e 2 minuti solo con CO₂ a 120 bar e 22°C.

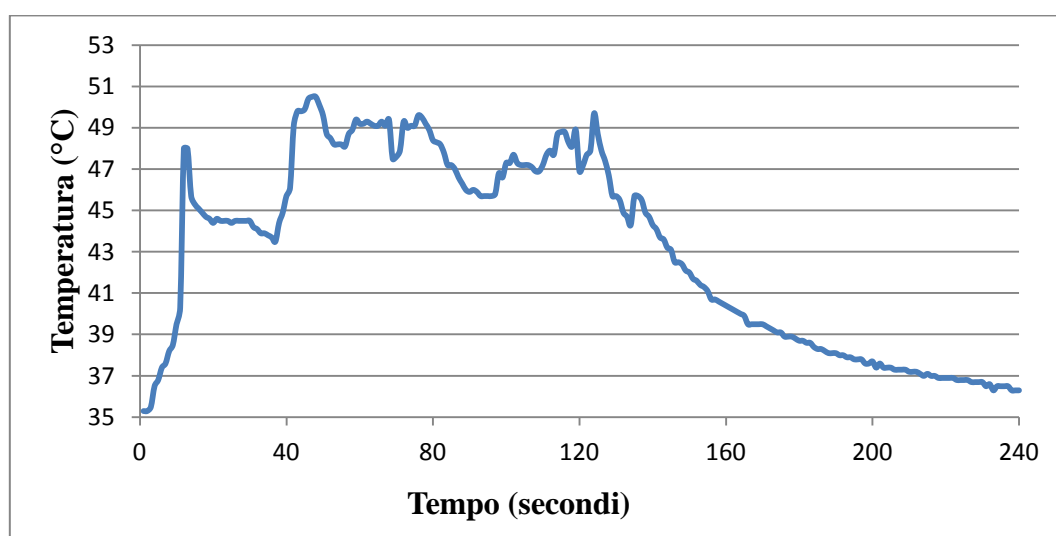


Figura 4.8. Andamento della temperatura nel campione, 2 minuti di trattamento combinato e 2 minuti solo con CO₂ a 120 bar e 35°C.

In Figura 4.9 (a e b) e 4.10 (a e b) sono rappresentate rispettivamente le cinetiche di abbattimento della flora mesofila, dei coliformi, dei lattobacilli e delle muffe e lieviti per il trattamento solo con CO₂ e per il trattamento combinato ultrasuoni e CO₂ ottenute alla temperatura di 22°C.

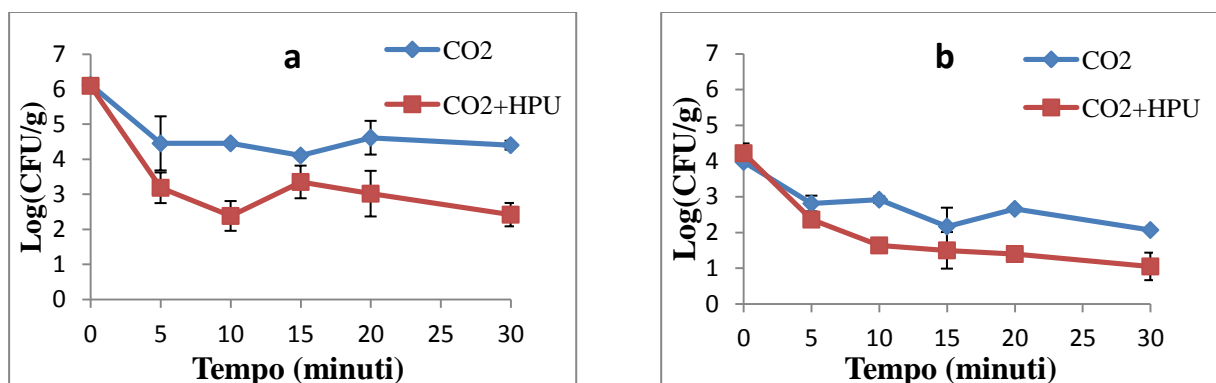


Figura 4.9. Cinetica di disattivazione della flora mesofila (a) e dei lattobacilli (b) del cocco, CO₂ (120 bar, 22°C) e CO₂+HPU (120 bar, 22°C, 8 W)

Dai grafici si osserva che, dopo una prima fase di rapido abbattimento, la velocità di disattivazione diminuisce sensibilmente non permettendo di ottenere, neanche con il trattamento combinato, la disattivazione totale della carica mesofila del campione.

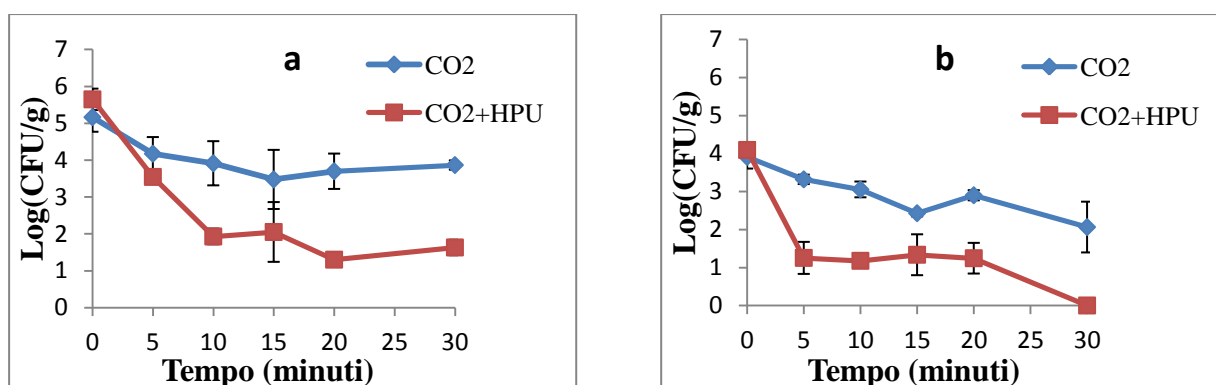


Figura 4.10. Cinetica di disattivazione dei coliformi (a) e delle muffe e lieviti (b) del cocco, CO₂ (120 bar, 22°C) e CO₂+HPU (120 bar, 22°C, 8 W)

La frazione microbica composta dalle muffe e lieviti risulta invece più sensibile al trattamento combinato permettendo di ottenere la disattivazione completa del campione in 30 minuti, per quanto riguarda i coliformi il trattamento combinato risulta più efficace del solo trattamento con CO₂, non permettendo comunque la disattivazione completa.

Nonostante una certa incostanza nei risultati di abbattimento ai vari tempi di trattamento, dovuti alla notevole variabilità della flora naturale presente sui pezzi di cocco, si osserva come il trattamento combinato abbia un importante effetto sulla cinetica di disattivazione permettendo, a fine trattamento, di ottenere in media un abbattimento di due unità logaritmiche in più rispetto al solo trattamento in pressione.

In Figura 4.11 (a e b) e 4.12 (a e b) sono rappresentate rispettivamente le cinetiche di abbattimento della flora mesofila e dei lattobacilli e dei coliformi e muffe e lieviti per il trattamento con CO₂, e per il trattamento combinato con ultrasuoni e CO₂ ottenute alla temperatura di 35°C.

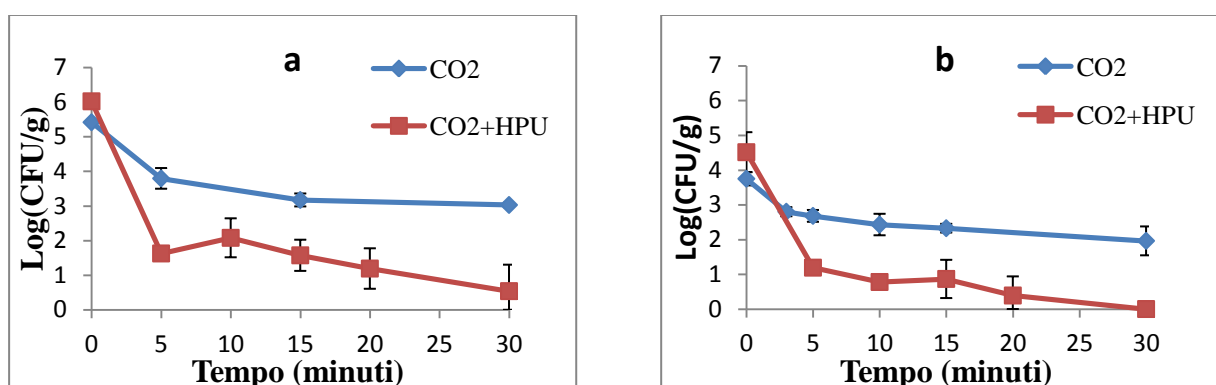


Figura 4.11. Cinetica di disattivazione della flora mesofila (a) e lattobacilli (b) del cocco, CO₂ (120 bar, 35°C) e CO₂+HPU (120 bar, 35°C, 8 W)

Anche alla temperatura di 35°C la flora mesofila si dimostra resistente sia al trattamento in pressione che al trattamento combinato, dato che alla fine del trattamento è ancora presente una contaminazione di circa 0.5 log. I lattobacilli sono invece ridotti completamente nel corso del trattamento combinato in un tempo di 30 minuti.

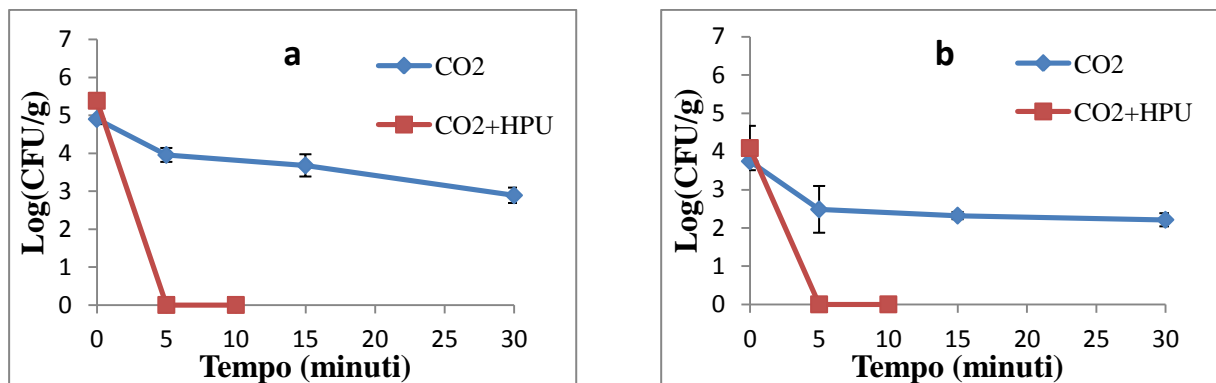


Figura 4.12. Cinetica di abbattimento dei coliformi (a) e di muffe e lieviti (b) del cocco, CO_2 (120 bar, 35°C) e CO_2 +HPU (120 bar, 35°C , 8 W)

Per il trattamento in pressione a 35°C la cinetica di disattivazione è simile a quella ottenuta a 22°C , il trattamento combinato di ultrasuoni e CO_2 permette però la completa disattivazione dei coliformi e delle muffe e lieviti presenti sul campione in un tempo di 5 minuti.

Si può quindi concludere che il trattamento combinato permette di ridurre in modo efficace la flora naturale del cocco senza la necessità di utilizzare condizioni di temperatura drastiche applicate per tempi più lunghi le quali potrebbero influire negativamente sulle caratteristiche del prodotto.

4.3 Cinetiche di disattivazione di *Escherichia coli* su carota

Le cinetiche di abbattimento di *E. coli* sono state ottenute a 60, 80 e 100 bar alla temperatura di 22°C al variare del tempo di trattamento da 0 a 30 minuti per il trattamento solo con CO_2 e da 0 a 15 minuti per il trattamento combinato e, alla temperatura di 35°C , per entrambi i trattamenti, al variare del tempo di trattamento da 0 a 15 minuti.

In Figura 4.13 e 4.14 sono riportati i profili di temperatura nel campione sottoposto al trattamento combinato. Per il campione trattato a 22°C all'aumentare della pressione di trattamento aumenta la temperatura del campione pur erogando sempre la stessa potenza. Ciò dipende dal fatto che all'aumentare della pressione diminuisce la comprimibilità della CO_2 permettendo agli ultrasuoni di propagarsi in modo più efficace all'interno del reattore.

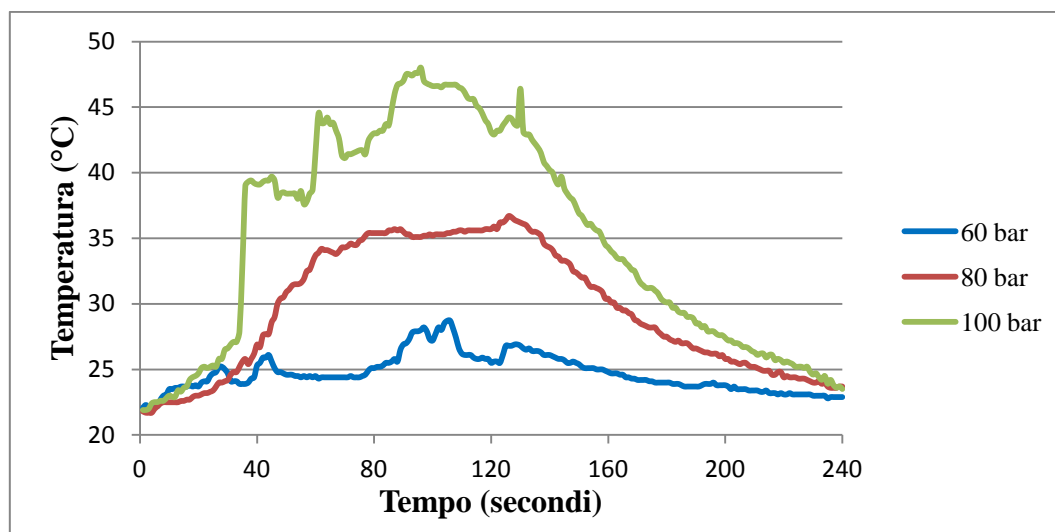


Figura 4.13. Andamento della temperatura nel campione, 2 minuti di trattamento combinato e 2 minuti solo con CO₂ alla pressione di 60, 80 e 100 bar e temperatura di trattamento di 22°C

Per il trattamento a 35°C la differenza di temperatura massima registrata, raggiunta dal campione alle tre condizioni di pressione, è di circa 7°C, molto meno marcata rispetto a quella registrata nei trattamenti a 22°C in cui si ha una differenza di temperatura massima di circa 20°C (aumentando la pressione di trattamento da 60 a 100 bar).

Per entrambe le prove di abbattimento in ogni caso la temperatura raggiunta dal campione alle diverse condizioni di pressione non sembra avere un effetto diretto sul tempo necessario per avere la disattivazione completa del campione, infatti, per il trattamento a 22°C si ha disattivazione completa a tutte le condizioni di pressione in un tempo di 7 minuti.

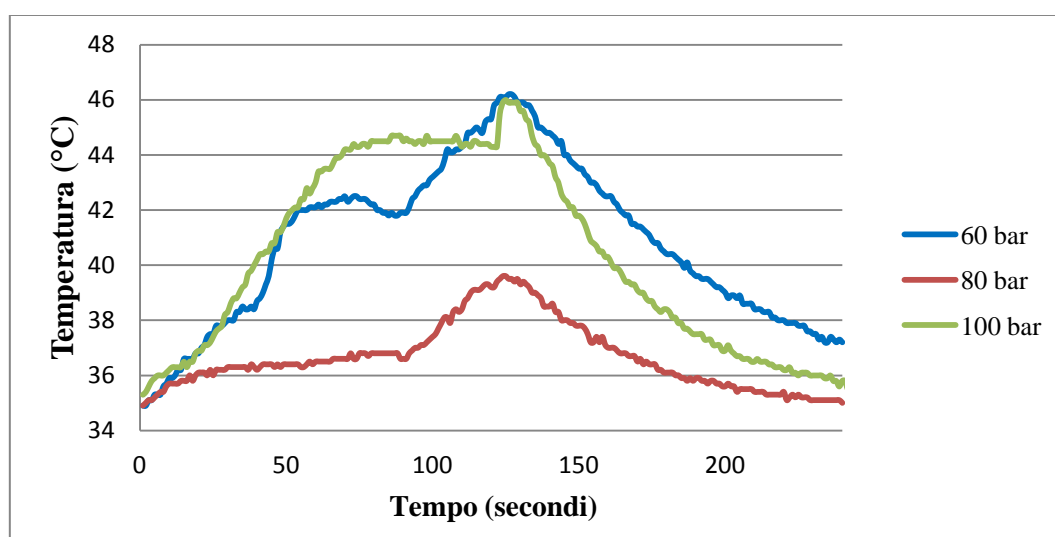


Figura 4.14. Andamento della temperatura nel campione, 2 minuti di trattamento combinato e 2 minuti solo con CO₂ alla pressione di 60, 80 e 100 bar e temperatura di trattamento di 35°C

In Figura 4.15, sono riportate le cinetiche di disattivazione di *E. coli* a 22°C. I dati di abbattimento sono espressi come il $\text{Log}(CFU/CFU_0)$ dove CFU ed CFU_0 .

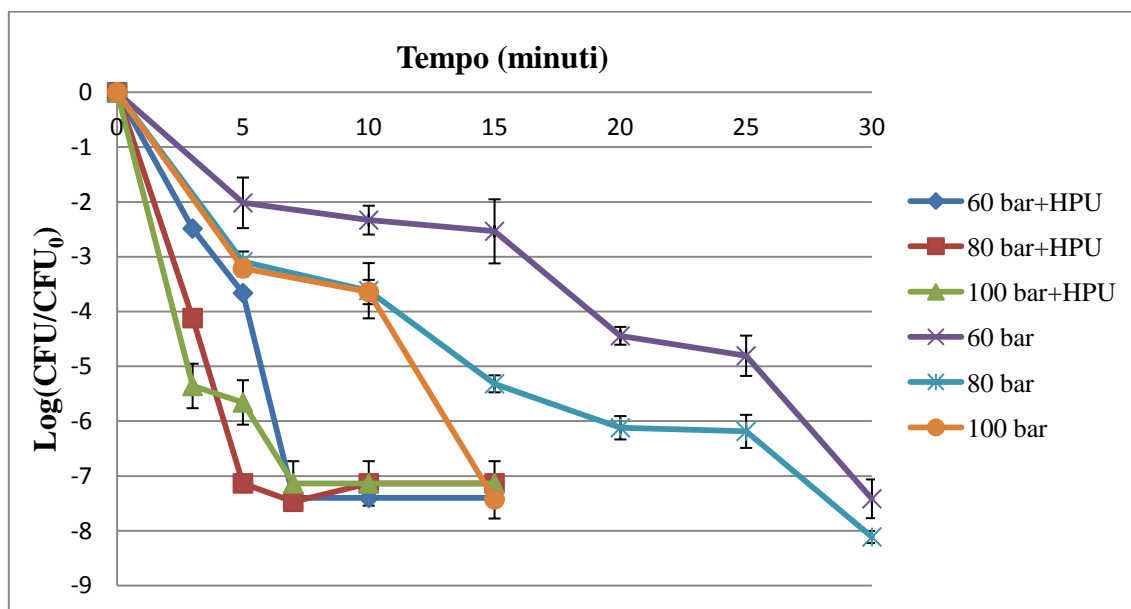


Figura 4.15. Cinetica di disattivazione di *E.coli* inoculata su carota, CO_2 (60, 80, 100 bar; 22°C) e CO_2 +HPU (60, 80, 100 bar, 22°C, 8W), i punti a 7 minuti per i trattamenti combinati, a 15 minuti alle pressioni di 100 bar e a 30 minuti a 60 e 80 bar indicano una disattivazione completa della carica microbica inoculata sul campione.

Dal grafico si osserva che il trattamento combinato permette di ottenere un abbattimento completo, o comunque al di sotto del limite di rilevabilità del metodo di conta su piastra (calcolato pari a 30 ufc/g), di circa 8 unità logaritmiche in un tempo di 7 minuti a 22°C per tutte le condizioni di pressione.

Anche il trattamento in pressione è in grado di abbattere totalmente la carica microbica ma in tempi molto più lunghi: 30 minuti a 60 e 80 bar e 15 minuti a 100 bar.

Dalle cinetiche di disattivazione di *E. coli* a 60, 80 e 100 bar e 35°C, riportate in Figura 4.16, si osserva che il trattamento combinato induce una disattivazione completa in 3 minuti alla pressione di 100 bar e in 5 minuti alla pressione di 80 bar. A 60 bar sono invece necessari 7 minuti come nel caso del trattamento a 22°C.

Per il solo trattamento in pressione sono invece necessari 10 minuti a 100 bar e 15 minuti a 80 bar per avere la disattivazione completa del campione. In questo caso, quindi, l'effetto sulla velocità di disattivazione, causato da una maggior fluidità di membrana e dallo stato supercritico della CO_2 , è evidente se confrontato con le curve ottenute alla temperatura di 22°C.

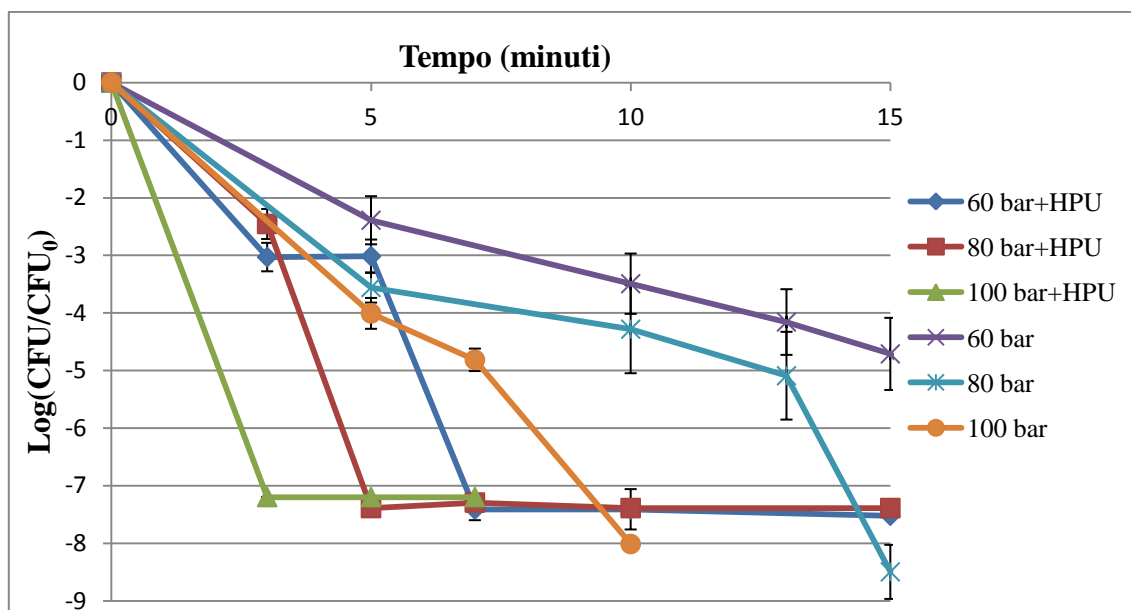


Figura 4.16. Cinetica di disattivazione di *E.coli* inoculata su carota, CO_2 (60, 80, 100 bar; $35^\circ C$) e CO_2 +HPU (60, 80, 100 bar, $35^\circ C$, 8W), i punti a 3 minuti a 100 bar, 5 minuti a 80 bar e 7 minuti a 60 bar per il trattamento combinato, a 10 minuti alle pressioni di 100 bar e a 15 minuti a 80 bar indicano una disattivazione completa della carica microbica inoculata sul campione.

Confrontando le curve di disattivazione per il trattamento combinato alle due diverse temperature di processo non si osserva invece una differenza apprezzabile. Quindi, anche in questo caso, l'effetto degli ultrasuoni a livello di disturbo della membrana e di aumento della velocità di diffusione della CO_2 sono maggiori rispetto ai benefici dati dal fatto che la CO_2 , alle pressioni di 80 e 100 bar, è in fase supercritica.

4.3 Cinetiche di disattivazione della flora naturale della carota

Le cinetiche di disattivazione della flora naturale della carota sono state ottenute a 120 bar e alla temperatura di $22^\circ C$ e $35^\circ C$ variando il tempo di trattamento da 0 a 30 minuti. L'andamento della temperatura nel campione di carota durante il trattamento combinato è simile a quello del cocco, arrivando a una temperatura massima di $37^\circ C$ per il trattamento condotto a $22^\circ C$ e di $47^\circ C$ per quello a $35^\circ C$.

In Figura 4.17 (a e b) e 4.18 (a e b) sono rappresentate rispettivamente le cinetiche di abbattimento della flora mesofila, dei lattobacilli, dei coliformi, e delle muffe e lieviti per il trattamento solo con CO_2 e per il trattamento combinato ultrasuoni più CO_2 ottenute alla temperatura di $22^\circ C$ e pressione di 120 bar.

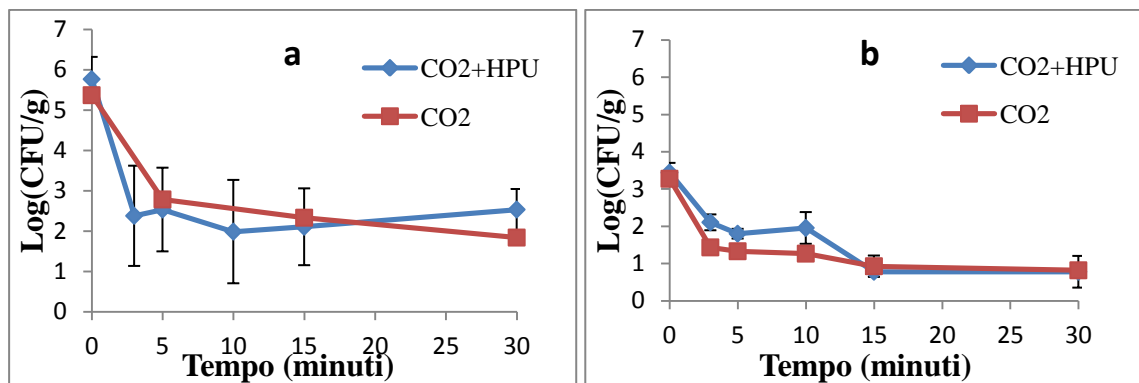


Figura 4.17. Cinetica di disattivazione della flora mesofila (a) e dei lattobacilli (b) della carota, CO_2 (120 bar, 22°C) e CO_2 +HPU (120 bar, 22°C, 8 W)

Dai grafici si osserva che il trattamento combinato applicato sulla carota alla temperatura di 22°C ha un'efficacia paragonabile a quella del trattamento con CO_2 nel caso della flora mesofila e dei batteri lattici.

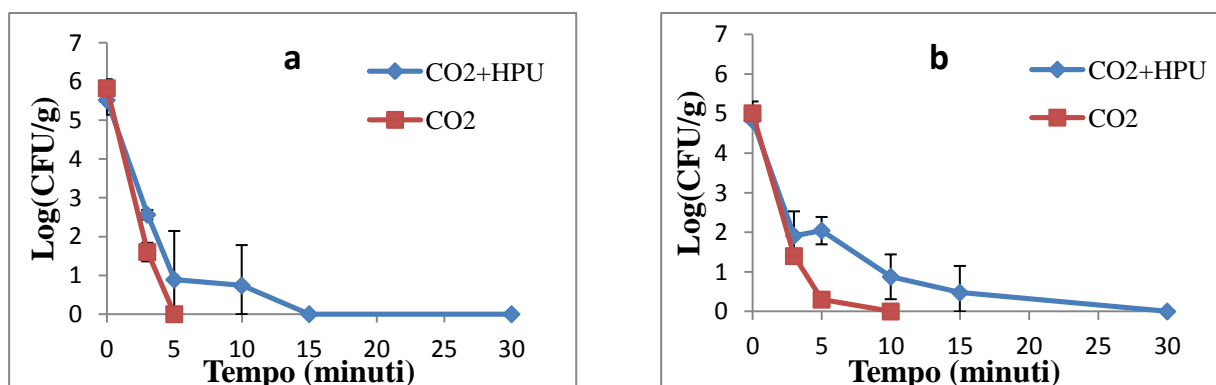


Figura 4.18. Cinetica di disattivazione dei coliformi (a) e delle muffe e lieviti (b) della carota, CO_2 (120 bar, 22°C) e CO_2 +HPU (120 bar, 22°C, 8 W)

Per quanto riguarda i coliformi e muffe e lieviti il trattamento combinato sembra essere meno efficace del solo trattamento in pressione, ed in ogni caso la differenza di disattivazione tra i due trattamenti non sembra essere statisticamente significativa.

In Figura 4.19 (a e b) sono rappresentate rispettivamente le cinetiche di abbattimento della flora mesofila, e dei lattobacilli per il trattamento solo con CO_2 e per il trattamento combinato ultrasuoni più CO_2 ottenute a 35°C e 120 bar.

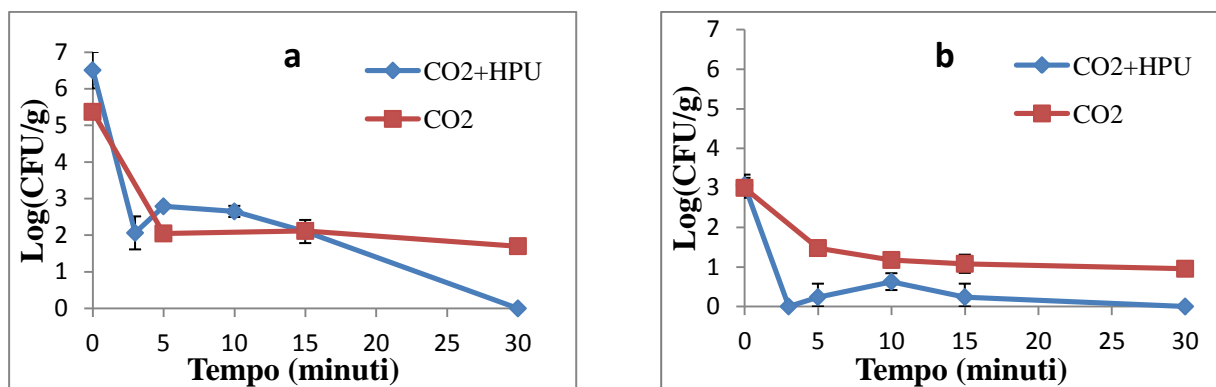


Figura 4.19. Cinetica di disattivazione della flora mesofila (a) e dei lattobacilli (b) della carota, CO₂ (120 bar, 35°C) e CO₂+HPU (120 bar, 35°C, 8 W)

Nei primi minuti del processo di pastorizzazione la flora mesofila mostra la stessa resistenza per entrambi i trattamenti. Il trattamento combinato permette però di ottenere la completa riduzione della carica batterica in 30 minuti.

Anche per i lattobacilli il trattamento combinato si dimostra più efficace del solo trattamento in pressione.

Le cinetiche relative ai coliformi e muffe e lieviti non sono riportate nelle figure, in quanto si ha la disattivazione completa in 5 minuti di trattamento combinato e trattamento con la sola CO₂.

Capitolo 5

Correlazione dei dati sperimentali e ipotesi di meccanismo

5.1 Possibile meccanismo di azione del trattamento combinato

Sulla base dei risultati sperimentali riportati nel §3 e nel §4, appare evidente come il trattamento combinato con ultrasuoni e CO₂ in pressione risulti essere molto più efficace del solo trattamento con CO₂ nel ridurre la carica microbica, sia quella inoculata sia presente naturalmente sul campione.

La spiegazione di questo risultato è da ricercarsi nell'azione combinata di più fenomeni che si verificano durante il trattamento.

La CO₂ supercritica è impiegata nelle operazioni di estrazione in quanto risulta essere più ecosostenibile, non tossica e più facilmente rimovibile rispetto ai comuni solventi organici, di contro sono necessarie alte pressioni operative con conseguenti maggiori problemi di sicurezza. Per migliorare il processo di estrazione con CO₂ supercritica è stato introdotto l'uso degli ultrasuoni, che aumentano l'efficienza del processo in virtù degli effetti meccanici che producono, in particolare vibrazioni ad alta frequenza, sbalzi di pressione e agitazione del sistema. L'insieme di questi fenomeni influiscono sulla resistenza al trasporto di materia tra il soluto e il solvente, diminuendola (Yun et al. 1997).

Se utilizzati in un mezzo liquido, gli ultrasuoni causano, oltre agli effetti di mixing su microscala, fenomeni di cavitazione. Le molecole di liquido sottoposte ad ultrasuoni vibrano e l'ampiezza della vibrazione aumenta con l'aumentare della potenza applicata. Oltre un certa ampiezza di vibrazione le forze intermolecolari non sono sufficienti a tenere unite le molecole portando così alla formazione di bolle, che durante i cicli di compressione e decompressione causati dagli ultrasuoni, diminuiscono e aumentano la loro dimensione fino a quando, raggiunta una dimensione critica, collassano. È stato stimato che in questa fase vengono raggiunte localmente temperature dell'ordine dei 5000 K e pressioni di 200 MPa, creando degli hot spot in grado di accelerare le reazioni chimiche. Inoltre, in corrispondenza del collasso delle bolle su una superficie, le alte temperature e pressioni generate portano alla formazione di micro getti diretti verso la superficie stessa, i quali causano la rottura delle pareti cellulari (Chemat et al. 2010).

Foladori et al. 2007, hanno valutato la sopravvivenza di *E. coli* nelle acque reflue sottoposte ad un trattamento solo con ultrasuoni a diversi valori di potenza. Si è visto che un'energia inferiore agli 80 KJ/L non ha effetti significativi sulla sopravvivenza di *E. coli* e con una potenza di 150 KJ/L si ha una riduzione del 24% del numero di cellule vitali.

A partire da queste considerazioni è possibile formulare alcune ipotesi riguardo ai benefici portati dagli ultrasuoni al processo di pastorizzazione.

Nelle prove sperimentali condotte in questa tesi le potenze utilizzate, per il trattamento in pressione di substrati solidi, riportate in Tabella 5.1, vanno da un minimo di 20 KJ/L fino a un massimo di 160 KJ/L per un tempo di trattamento totale di 30 minuti.

Per *S. enterica* in substrato solido si ha l'abbattimento completo (di 8 unità logaritmiche) alla temperatura di 40°C e alla pressione di 120 bar in 20 minuti, a cui corrisponde un'energia di 100 KJ/L, e in 10 minuti alla temperatura di 50°C e pressione di 120 bar, a cui corrisponde un'energia di 60 KJ/L.

Nel caso di *E. coli* su substrato solido a 22°C si ha l'abbattimento completo in 7 minuti a 60, 80 e 100 bar di pressione, un tempo al quale corrisponde un'energia erogata di 40 KJ/L. A 35°C, invece, l'abbattimento completo richiede 5 minuti alla pressione di 80 bar e con un'energia erogata di 30 KJ/L, mentre alla pressione di 100 bar essa si raggiunge in un tempo di 3 minuti, a cui corrisponde un'energia di 20 KJ/L.

Tabella 5.1. Potenza erogata dal sonotrodo al variare dei tempi di trattamento

Tempo totale trattamento (minuti)	Potenza media (KJ/L)		
	Solido	Liquido (CO ₂ +HPU)	Liquido (HPU)
1		65	40
3	20	180	120
5	30	280	200
7	40	440	280
10	60	610	400
15	80	915	600
20	100		
30	160		

Confrontando le energie utilizzate con la soglia di 80 KJ/l indicata da Foladori et al. (2007) è evidente come l'aumento nella velocità di disattivazione, riscontrato nelle cinetiche in solido, non sia da ricercarsi nel puro effetto meccanico degli ultrasuoni sulle cellule.

Pertanto quando gli ultrasuoni sono accoppiati al trattamento con CO₂ in fase supercritica, come nel nostro caso, l'aumento di velocità di disattivazione può essere attribuito al miglior mixing sulla superficie della cellula, che aumenta la diffusione della CO₂ attraverso la membrana cellulare e la conseguente più rapida diminuzione del pH intracellulare, ed accelera la velocità di tutti i fenomeni che concorrono alla morte del microrganismo (§1.1.1).

Anche nel caso in cui la CO₂ è in fase liquida gli ultrasuoni possono danneggiare meccanicamente le cellule; essendo però le energie in gioco molto basse, i danni meccanici non sono la causa della morte cellulare, ma in questo caso si assiste ad un fenomeno chiamato sonoporazione. In pratica le bolle, implodendo sulla superficie delle cellule, vanno a forare la membrana cellulare con conseguente miglior permeazione della CO₂ all'interno della cellula.

Un altro effetto dato dagli ultrasuoni è il riscaldamento del campione. Dalla Tabella 5.2 si vede che, in particolare, il campione di cocco trattato a 50°C e 120 bar raggiunge durante i cicli con ultrasuoni una temperatura di 70°C, temperatura che già da sola ha un effetto letale su *S. enterica*.

Tabella 5.2. Temperatura massima raggiunta dal campione durante il trattamento combinato CO₂ e ultrasuoni

Substrato	Pressione (bar)	Temperatura trattamento (°C)	Temperatura finale (°C)
Cocco	100	35	47
	120	22	33
		35	45
		40	50
		50	70
Carota	60	22	28
		35	46
	80	22	36
		35	44
	100	22	37
		35	46
	120	22	37
		35	47

Se si considerano poi i risultati delle prove con inoculo in fase liquida, riportati nel §3, e si osserva l'abbattimento ottenuto nei trattamenti singoli, ovvero solo ultrasuoni e solo CO₂, è

evidente che la disattivazione data dal trattamento combinato è circa uguale alla somma di quella ottenuta nei due trattamenti singoli. In fase liquida le energie utilizzate sono infatti molto maggiori e nel giro di 2 minuti si raggiunge la soglia di energia di 80 KJ/L indicata da Foladori et al. (2007).

5.2 Modello di fitting

Le cinetiche di disattivazione microbica sono state correlate utilizzando il programma GinaFit Geeraerd et al. (2005) e il modello di Weibull modificato (Mafart et al., 2002) descritto dall'equazione :

$$\text{Log}(N) = \text{Log}(N|_{t=0}) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p. \quad (5.1)$$

dove N indica la concentrazione di cellule al tempo t espressa in $\text{Log}(\text{CFU/g})$, $N|_{t=0}$ indica la concentrazione di cellule nel campione non trattato, p indica la concavità della curva; se $p < 1$ la velocità di morte diminuisce con il tempo, se $p = 1$ è invariante rispetto al tempo e se $p > 1$ aumenta con il tempo.

Il parametro δ rappresenta il termine di riduzione decimale, ovvero il tempo necessario per ridurre di un'unità logaritmica la popolazione batterica. Contrariamente al valore D , che riferito ad una cinetica del primo ordine rappresenta il tempo di riduzione decimale indipendentemente dalla durata del trattamento termico, il parametro δ è riferito solo alla prima riduzione decimale.

Il modello ha due inconvenienti, il primo è che la determinazione dei parametri viene fatta su base puramente statistica, il secondo è che, essendo p un coefficiente di forma, è fortemente correlato con il valore di δ . Ciò vuol dire che i due parametri non sono indipendenti, per cui un errore su δ viene corretto da un errore su p .

5.2.1 Cinetiche di *S. enterica* e flora naturale su cocco

In Tabella 5.3 sono riportati i parametri del modello di Weibull modificato per il trattamento di pezzi di cocco inoculati con *S. enterica*. È evidente come il trattamento combinato riduca il tempo di riduzione decimale rispetto al trattamento solo con CO_2 e come il parametro (p) tendenzialmente aumenti rispetto al trattamento solo con CO_2 supercritica.

Tabella 5.3. Valori dei parametri δ e p del modello di Weibull modificato per la disattivazione di *S. enterica* su cocco

Temperatura (°C)	Pressione (bar)	Trattamento	$\rho \text{ CO}_2$ (Kg/m ³)	δ	p
35	100	CO ₂	712	1.57	0.18
		CO ₂ +HPU		5.13	0.74
40	120	CO ₂	717	2.39	0.44
		CO ₂ +HPU		2.14	0.85
50	120	CO ₂	587	0.24	0.24
		CO ₂ +HPU		0.00031	0.2

Nei trattamenti dei campioni di cocco, Figura 5.1 e 5.2, l'andamento nella cinetica di disattivazione è diversa da quella osservata per i campioni di carota. In particolare si osserva, che a 35°C e 40°C, dopo un'iniziale riduzione di circa 2 unità logaritmiche, si ha una fase stazionaria della durata di 10 minuti per il trattamento a 40°C, seguita poi da una rapida disattivazione, fenomeno che il modello non riesce a seguire in modo corretto.

Le cinetiche relative al solo trattamento in pressione sono invece correlate in modo preciso dal modello.

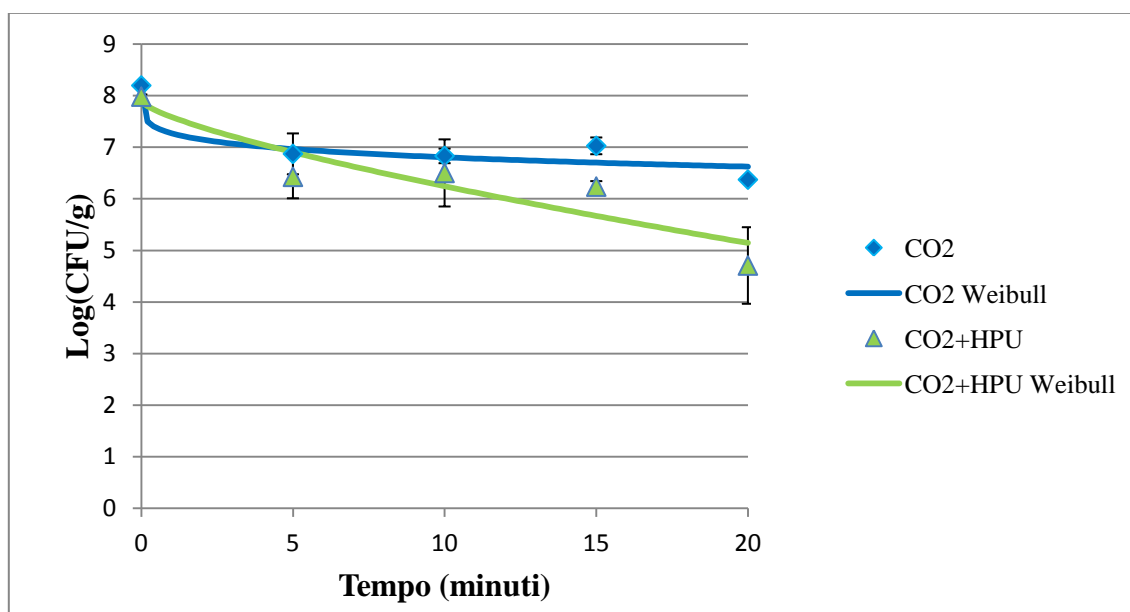


Figura 5.1 Cinetica di disattivazione di *S. enterica* 35°C e 100 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

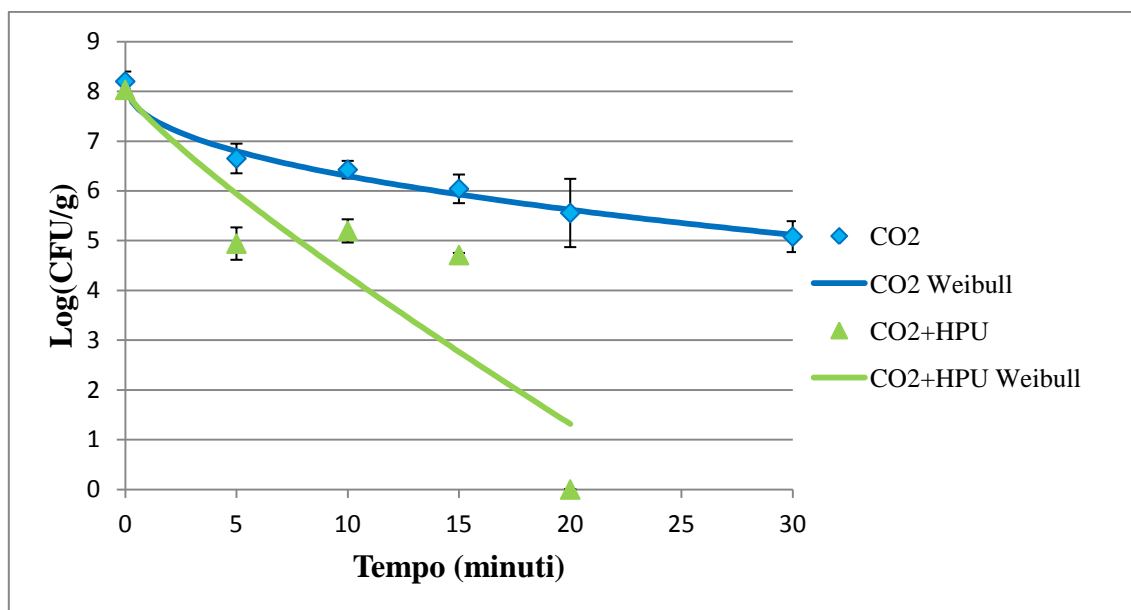


Figura 5.2. Cinetica di disattivazione di *S. enterica* a 40°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

Nel trattamento a 50°C, Figura 5.3, si ha invece la disattivazione completa del campione nei primi 3 minuti di trattamento. La spiegazione di questo fenomeno è da ricercarsi nel rapido riscaldamento da parte degli ultrasuoni piuttosto che in un effetto dato dal trattamento in pressione. Il modello scelto fitta in modo corretto la cinetica relativa al trattamento in pressione, i punti sperimentali relativi al trattamento combinato non sono però sufficienti per confermare l'accuratezza del modello nella descrizione della cinetica di disattivazione.

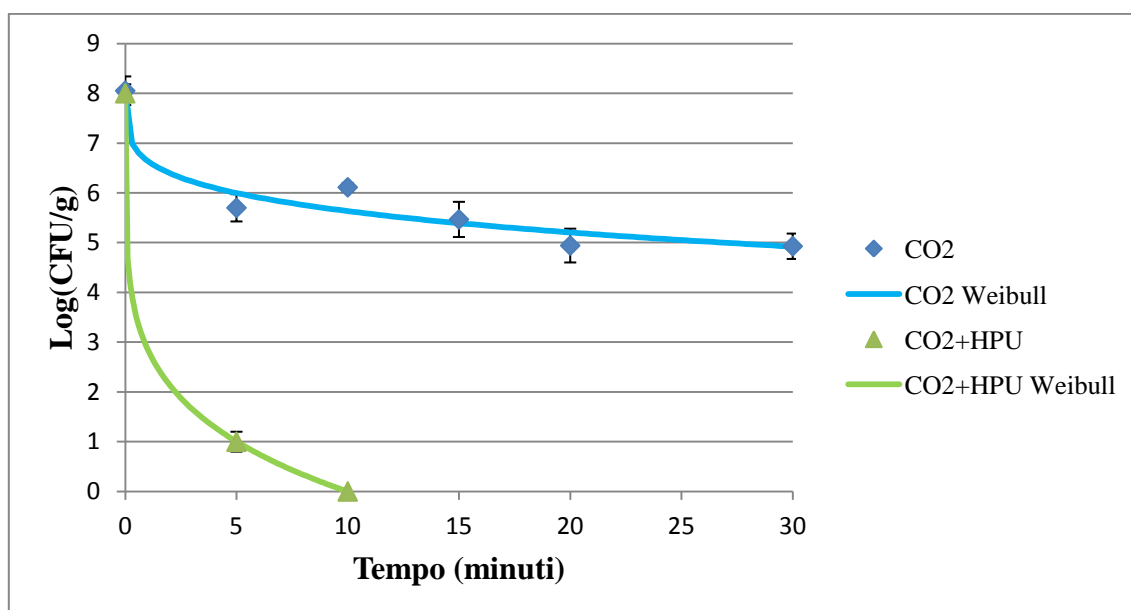


Figura 5.3. Cinetica di disattivazione di *S. enterica* a 50°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

La flora naturale presente sul cocco risulta molto sensibile al trattamento combinato. Dal fitting dei dati ottenuti con il modello di Weibull modificato, Tabella 5.4, si osserva che il parametro δ per il trattamento combinato è molto più piccolo rispetto a quello del trattamento solo con CO₂. Il parametro p non presenta grandi variazioni. Solo nel caso di muffe e lieviti a 22°C si osserva una marcata differenza nei valori di p tra i due trattamenti: per quello combinato, dopo una rapida morte della quasi totalità della carica batterica nei primi minuti, si ha una fase di lenta diminuzione della carica residua a cui corrisponde un valore piccolo del parametro p .

Tabella 5.4. Valori dei parametri δ e p del modello di Weibull modificato per la disattivazione della flora naturale del cocco alla pressione di 120 bar

Temperatura (°C)	ρ CO ₂ (Kg/m ³)	Microrganismo	Trattamento	δ	p
22°C	865	Mesofili	CO ₂	1.6	0.2
			CO ₂ + HPU	0.00003	0.08
		Coliformi	CO ₂	5.2	0.25
			CO ₂ + HPU	0.18	0.29
		Lattobacilli	CO ₂	4.16	0.3
			CO ₂ + HPU	0.49	0.27
		Muffe e lieviti	CO ₂	11.93	0.6
			CO ₂ + HPU	0.04	0.19
35°C	767	Mesofili	CO ₂	0.41	0.21
			CO ₂ + HPU	0.00045	0.15
		Coliformi	CO ₂	10.82	0.65
			CO ₂ + HPU		
		Lattobacilli	CO ₂	5	0.3
			CO ₂ + HPU	0.0045	0.17
		Muffe e lieviti	CO ₂	4.32	0.29
			CO ₂ + HPU		

Di seguito nelle Figure 5.4, 5.5, 5.6 e 5.7 sono riportati rispettivamente i grafici riguardanti la disattivazione della flora mesofila, dei coliformi, dei batteri lattici e delle muffe e lieviti a 22°C e 120 bar.

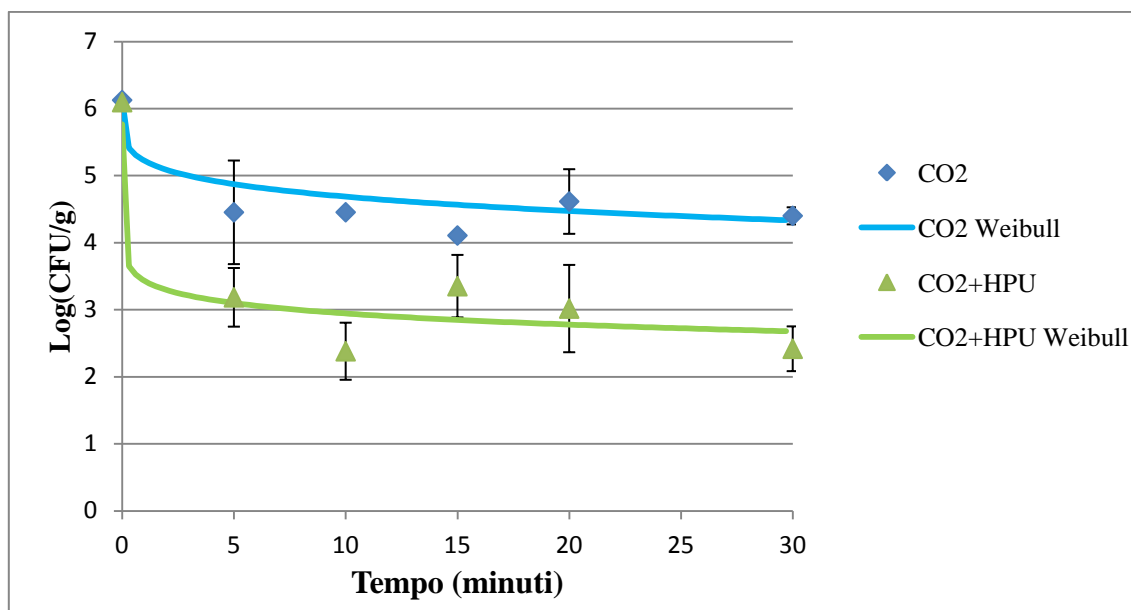


Figura 5.4. Cinetica di abbattimento della flora mesofila totale a 22°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

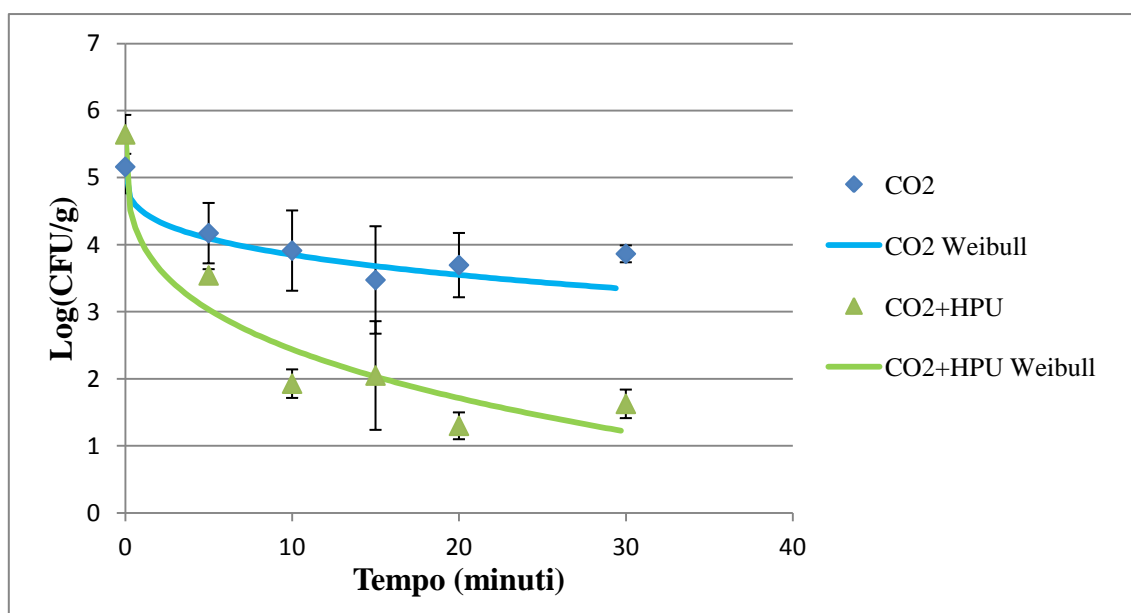


Figura 5.5. Cinetica di abbattimento dei coliformi 22°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

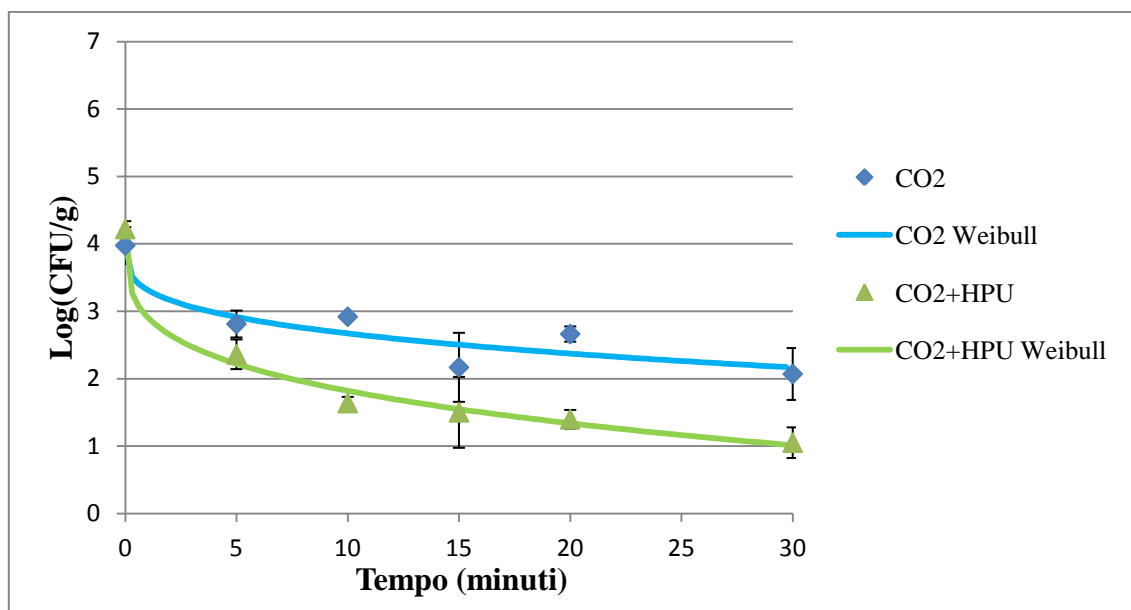


Figura 5.6. Cinetica di abbattimento di lattobacilli a 22°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

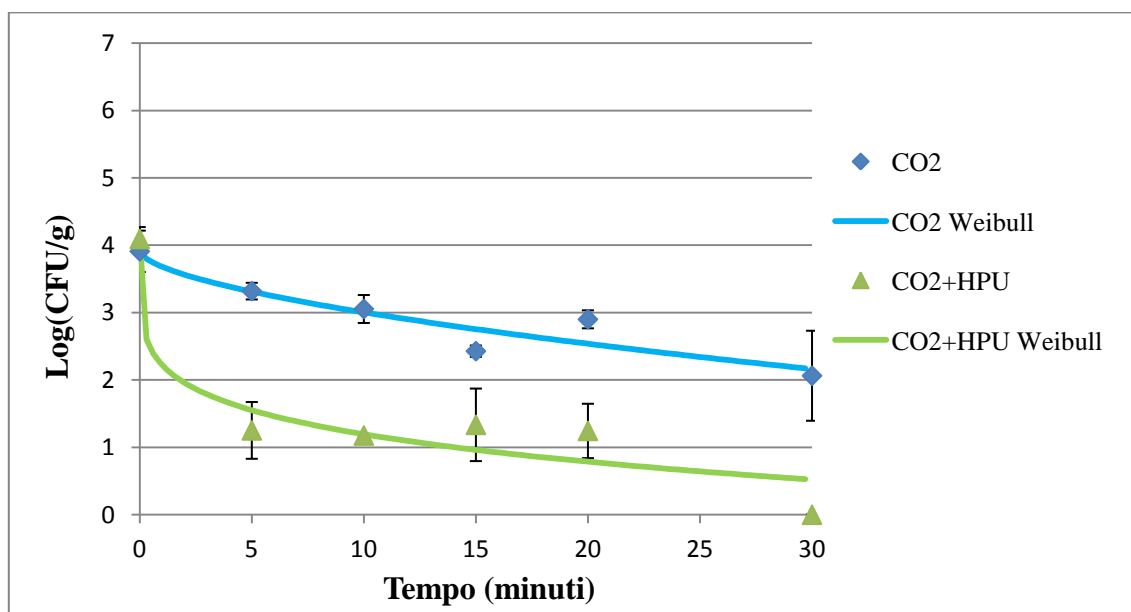


Figura 5.7. Cinetica di abbattimento di muffe e lieviti a 22°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

Confrontando i dati sperimentali con i risultati ottenuti dal modello si osserva come questo fitti in modo più che soddisfacente le cinetiche sperimentali, sia per quanto riguarda quelle relative al trattamento con la sola CO₂, che quelle relative al trattamento combinato.

Lo stesso si può dire per i risultati ottenuti dalle cinetiche a 35°C e 120 bar riportati nelle Figure 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11. Le cinetiche di disattivazione di coliformi e muffe e lieviti

relative al trattamento combinato con CO₂ e ultrasuoni non sono riportate in quanto avendo la disattivazione completa in 5 minuti di trattamento e non essendo stata valutata la carica microbica per tempi inferiori non è possibile applicare il modello.

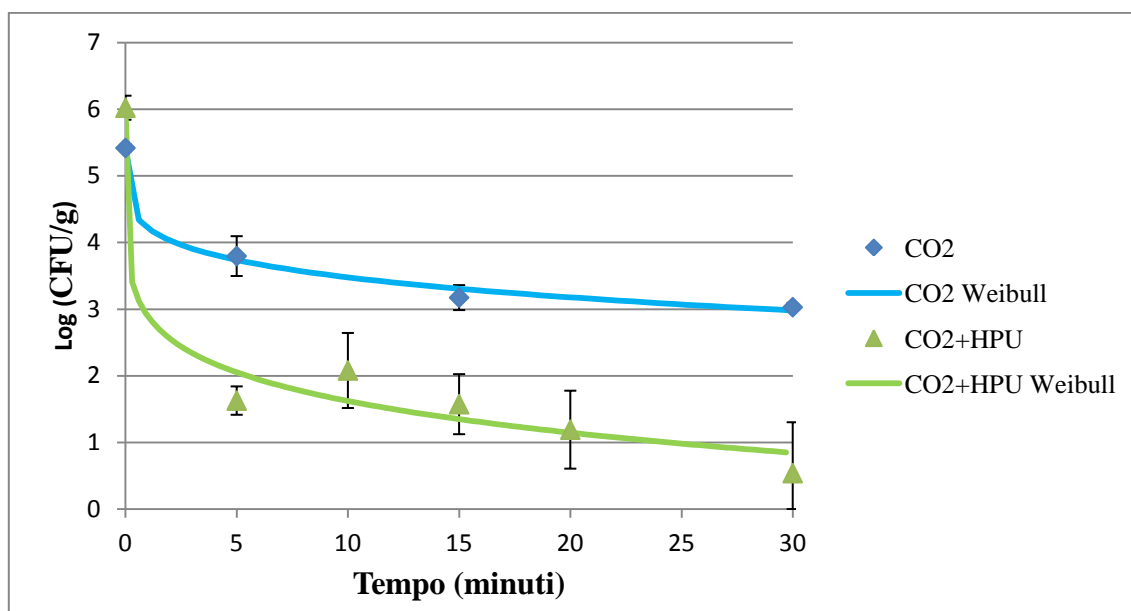


Figura 5.8. Cinetica di abbattimento della flora mesofila totale a 35°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

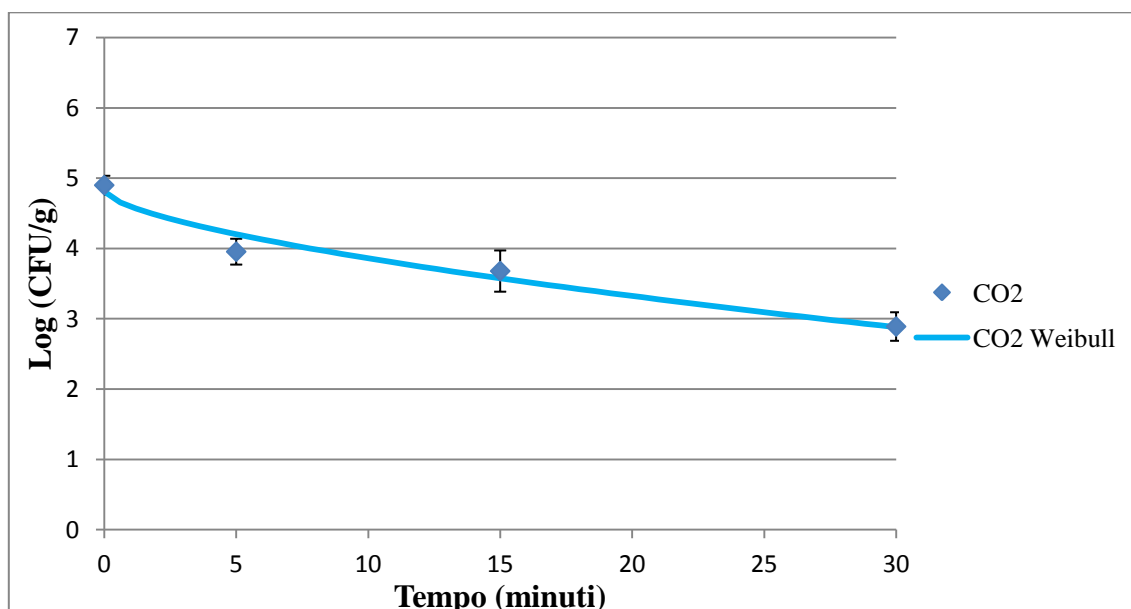


Figura 5.9. Cinetica di abbattimento dei coliformi 35°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

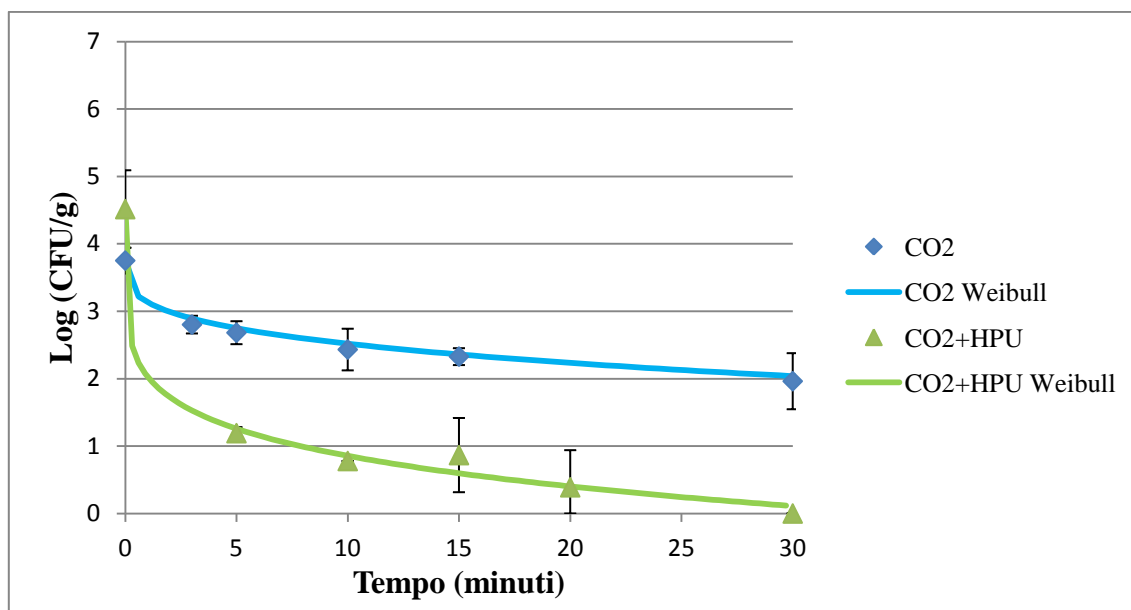


Figura 5.10. Cinetica di abbattimento dei lattobacilli a 35°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

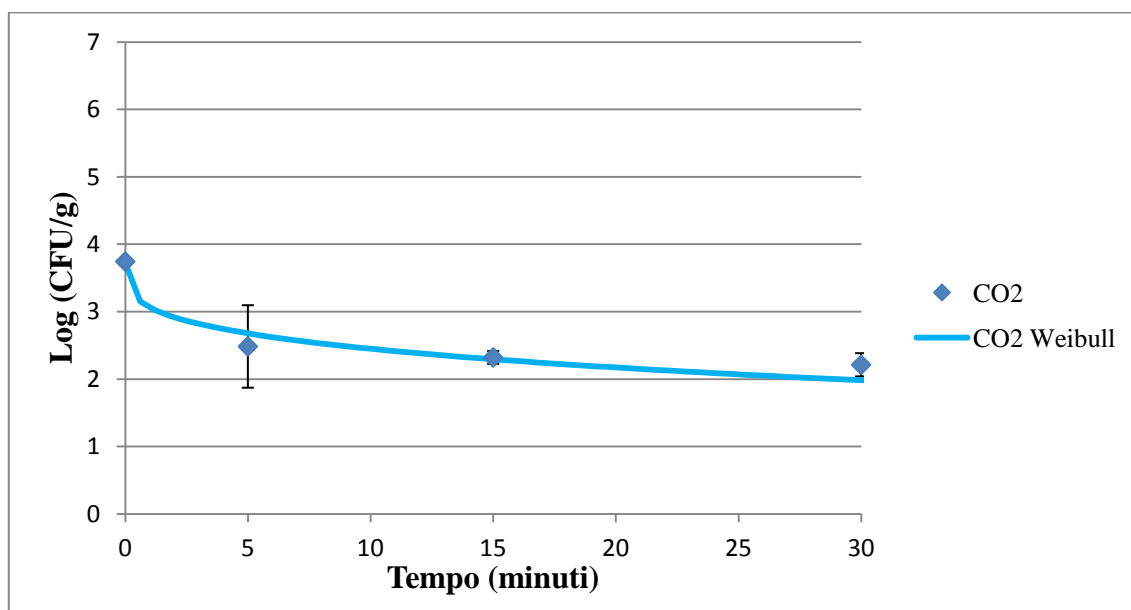


Figura 5.11. Cinetica di abbattimento dei muffe e lieviti a 35°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

La correlazione dei risultati ottenuti con *S. enterica* nelle prove di disattivazione in liquido alla temperatura di 24°C e 35°C e alla pressione di 100 bar, è riprodotta in Tabella 5.5.

Tabella 5.5. Valori dei parametri δ e p del modello di Weibull modificato per la disattivazione di *S. enterica* in una soluzione tampone peptone fosfato sterile

Temperatura (°C)	Pressione (bar)	Trattamento	$\rho \text{ CO}_2$ (Kg/m ³)	δ	p
24	100	HPU	825	2.12	0.55
		CO ₂		0.00024	0.10
		CO ₂ +HPU		0.45	0.23
35	100	HPU	712	4.69	0.88
		CO ₂		0.02	0.21
		CO ₂ +HPU		0.33	0.55

Dalle Figure 5.12 e 5.13, in cui sono riportate i profili sperimentali e quelli ottenuti con il modello si osserva come quest'ultimo riproduca in modo più che soddisfacente i valori sperimentali.

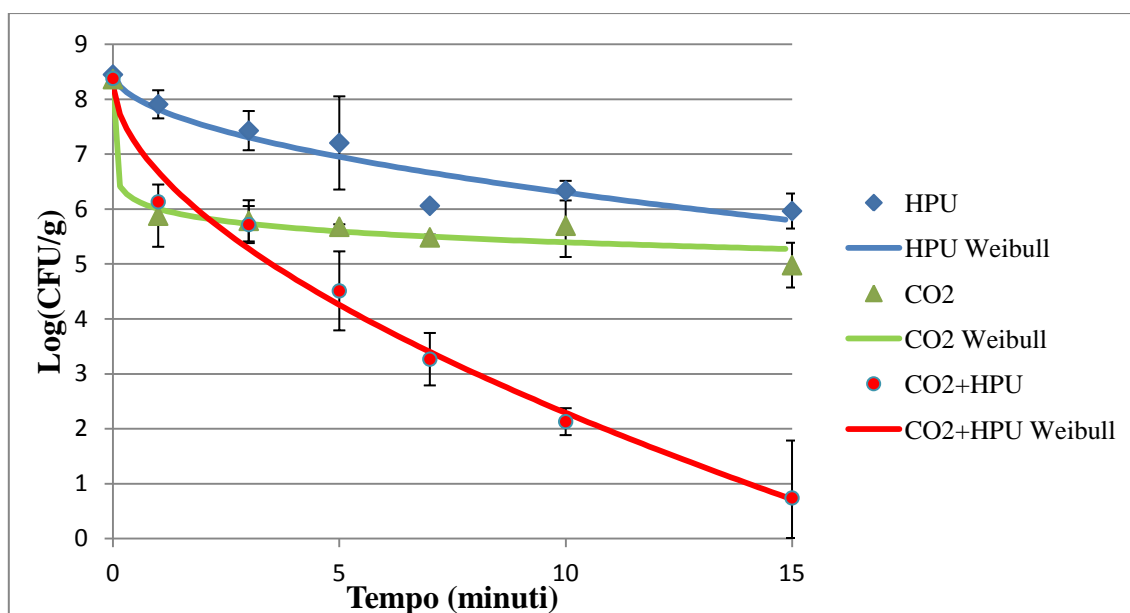


Figura 5.12. Cinetica di disattivazione di *S. enterica* a 24°C e 100 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

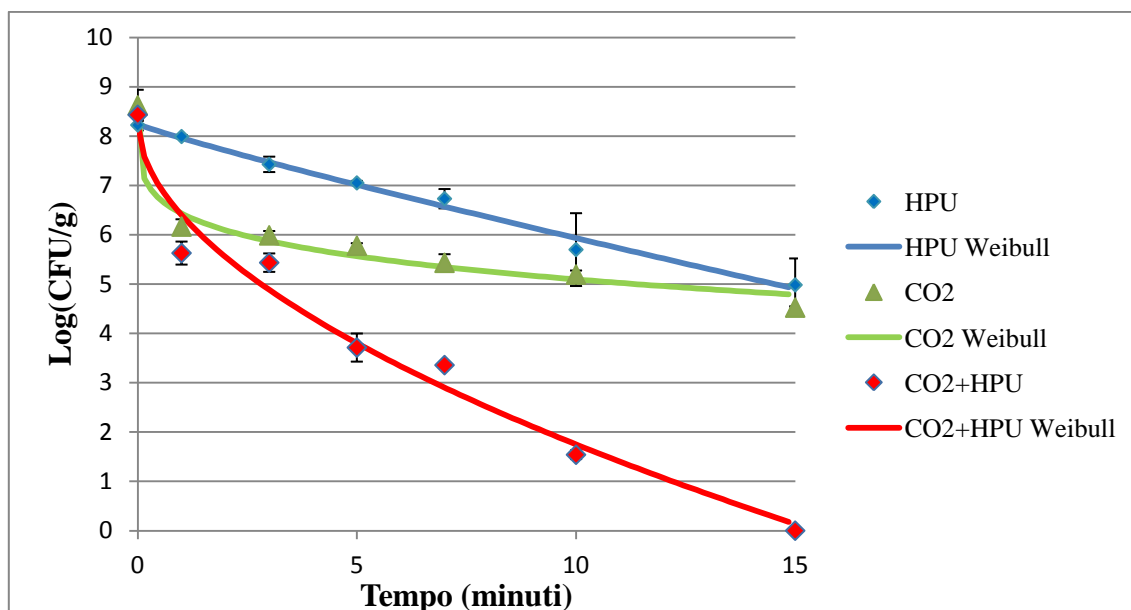


Figura 5.13. Cinetica di disattivazione di *S. enterica* a 35°C e 100 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

Per entrambe le temperature analizzate, 24°C e 35°C si osserva che il trattamento con ultrasuoni ha una cinetica di disattivazione quasi lineare in particolare quella ottenuta a 35°C, riportata in Figura 5.13, dove il parametro p assume un valore pari a 0.88.

5.2.2 Cinetiche di *E. coli* e flora naturale sulla carota

Osservando i valori di δ e p riportati in Tabella 5.6 per *E. coli* su carota si vede come il tempo necessario per la prima riduzione decimale per il trattamento combinato è molto simile a quello relativo al solo trattamento in pressione, il valore del parametro p indica però che nei minuti successivi alla prima riduzione decimale la velocità di abbattimento aumenta rispetto al solo trattamento in pressione.

Generalmente nelle cinetiche di disattivazione con CO₂ in pressione si osservano 3 fasi:

- un abbattimento iniziale abbastanza rapido in cui muore la frazione più sensibile della popolazione batterica;
- una fase stazionaria in cui la popolazione microbica diminuisce lentamente all'aumentare del tempo;
- una terza fase di rapido abbattimento.

Nel caso del trattamento combinato di ultrasuoni e CO₂ in pressione non si osservano tre diverse pendenze nella cinetica di abbattimento, ma si ha una rapida e consistente disattivazione nei primi minuti di trattamento. Pertanto non si ha una fase stazionaria e si arriva rapidamente alla disattivazione completa della carica microbica.

Tabella 5.6. Valori dei parametri δ e p del modello di Weibull modificato per la disattivazione di *E. coli* su carota, per il trattamento a 100 bar, 35°C non sono presenti i valori dei parametri in quanto si ha la disattivazione completa della carica microbica in un tempo inferiore al minimo preso in esame

Temperatura (°C)	Pressione (bar)	Trattamento	ρ CO ₂ (Kg/m ³)	δ	p
22	60	CO ₂	782	7.51	1,33
		CO ₂ +HPU		1.84	1.48
	80	CO ₂	809	0.94	0.58
		CO ₂ +HPU		0.90	1.18
	100	CO ₂	841	2.65	1,48
		CO ₂ +HPU		0.02	0.34
35	60	CO ₂	159	1.31	0.63
		CO ₂ +HPU		1.98	1.46
	80	CO ₂	419	1.37	0.80
		CO ₂ +HPU		1.97	2.13
	100	CO ₂	713	1.48	1.12
		CO ₂ +HPU			

I risultati riportati in seguito nelle Figure 5.14 e 5.15 sono relativi alle cinetiche di disattivazione a 22°C. I dati sperimentali sono confrontati con quelli forniti dal modello di Weibull.

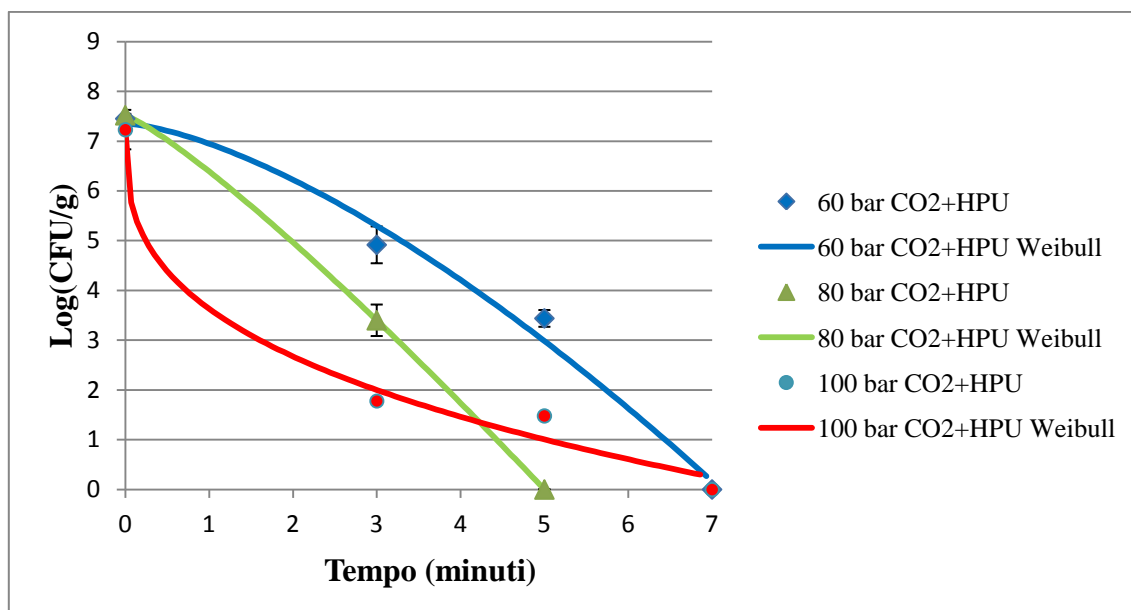


Figura 5.14. Cinetica di disattivazione di *E. coli* a 22°C con CO₂ e ultrasuoni, confronto tra dati sperimentali e modello

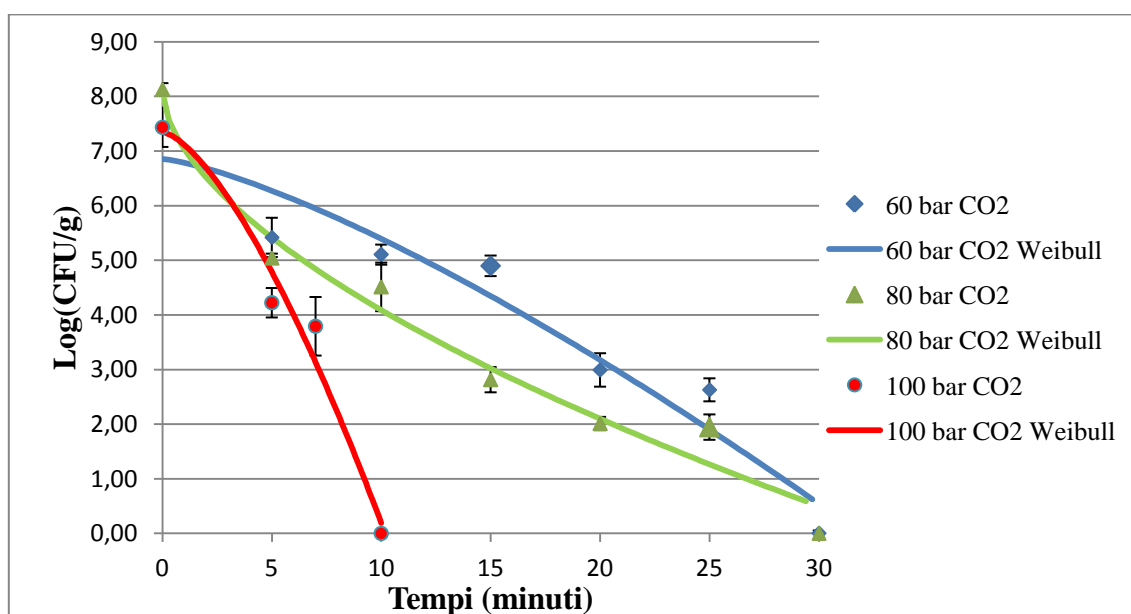


Figura 5.15. Cinetica di disattivazione di *E. coli* a 22°C con CO₂, confronto tra dati sperimentali e modello

Dalle figure 5.14 e 5.15 si nota come il modello riproduce in maniera soddisfacente i dati sperimentali, in particolare quelli riguardanti le cinetiche di abbattimento solo con CO₂ per le quali sono disponibili un maggior numero di punti sperimentali prima della disattivazione completa della carica microbica, cosa che permette di ottenere valori più affidabili per il modello.

In Figura 5.16 e 5.17 sono riportate le cinetiche di disattivazione a 35°C. Anche in questo caso si nota che il modello fitta in modo più accurato le cinetiche di disattivazione con CO₂ supercritica, il modello non riesce però a seguire con precisione la cinetica di disattivazione alla pressione di 80 bar in quanto si ha una rapida morte del microrganismo dopo 13 minuti di trattamento. La cinetica di disattivazione a 100 bar, 35°C non è riportata in quanto si ha la disattivazione completa in 3 minuti di trattamento.

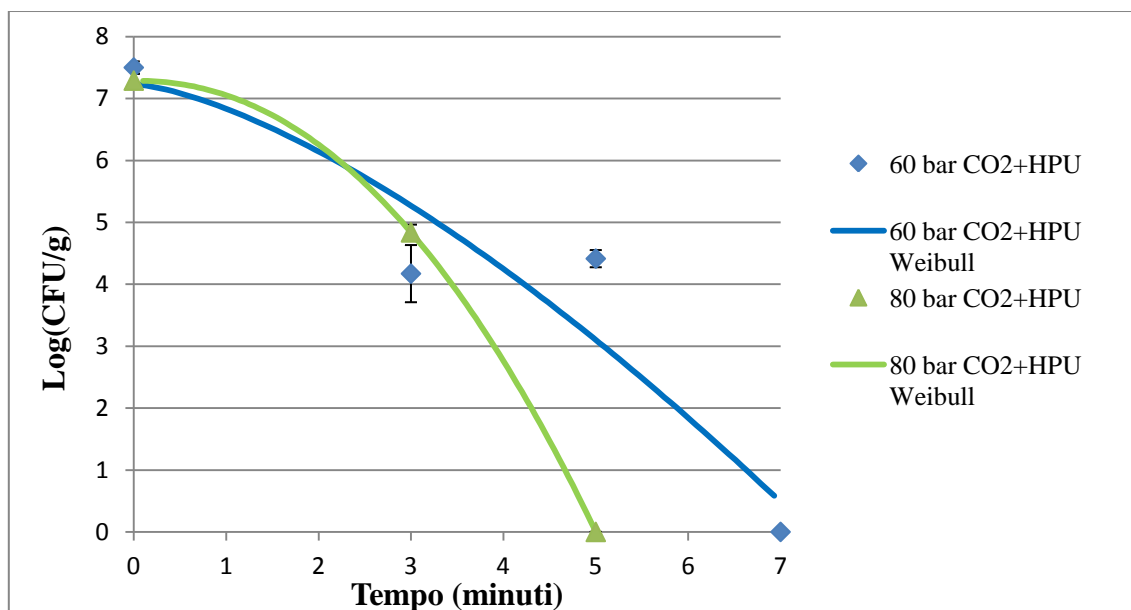


Figura 5.16. Cinetica di disattivazione di *E. coli* a 35°C con CO₂ e ultrasuoni, confronto tra dati sperimentali e modello

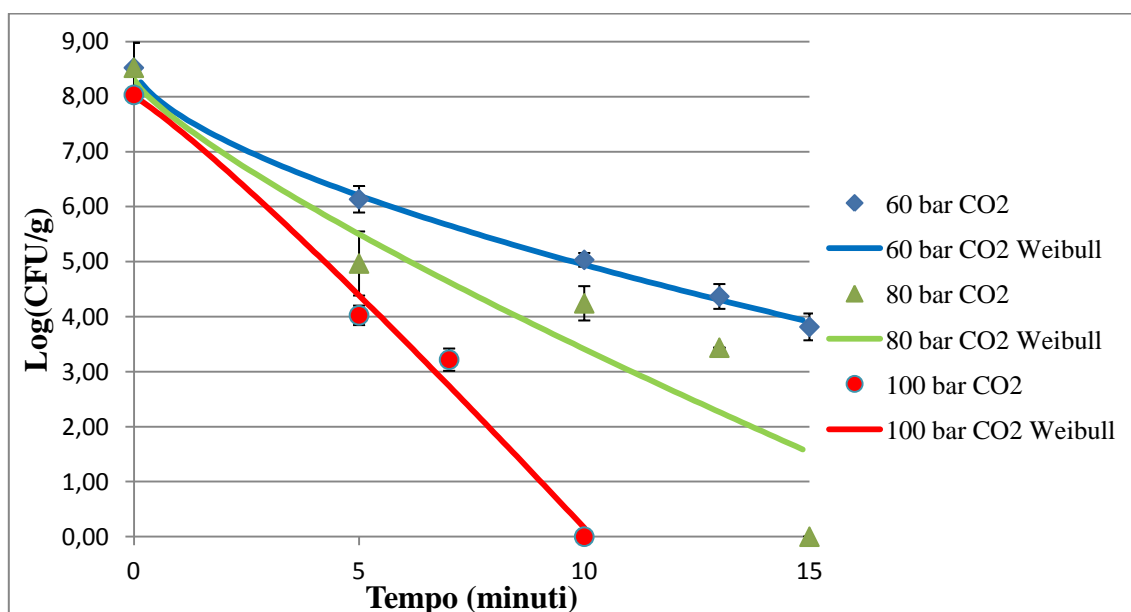


Figura 5.17. Cinetica di disattivazione di *E. coli* a 35°C con CO₂, confronto tra dati sperimentali e modello

In Figura 5.18 e 5.19 sono riportati gli andamenti dei parametri δ e p in funzione di temperatura e pressione per il trattamento con CO_2 in pressione di *E. coli*. È evidente come all'aumentare della pressione in fase supercritica il parametro δ diminuisce, un andamento che risulta ancora più evidente confrontando il parametro δ con la densità, Figura 5.19.

Ciò è dovuto al fatto che in fase supercritica un aumento della pressione corrisponde a un rapido aumento della densità della CO_2 e del suo potere solvente.

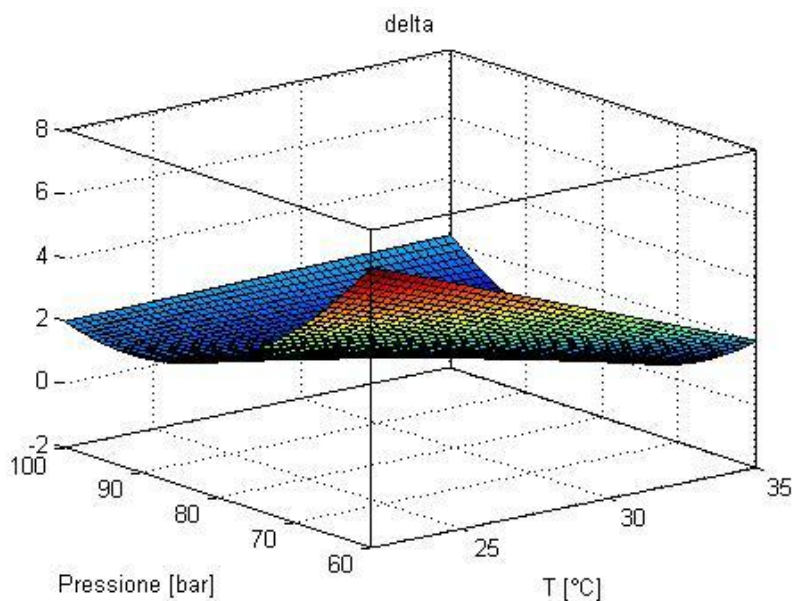


Figura 5.18. Andamento del parametro δ in funzione di temperatura e pressione per il trattamento con CO_2 di *E. coli*

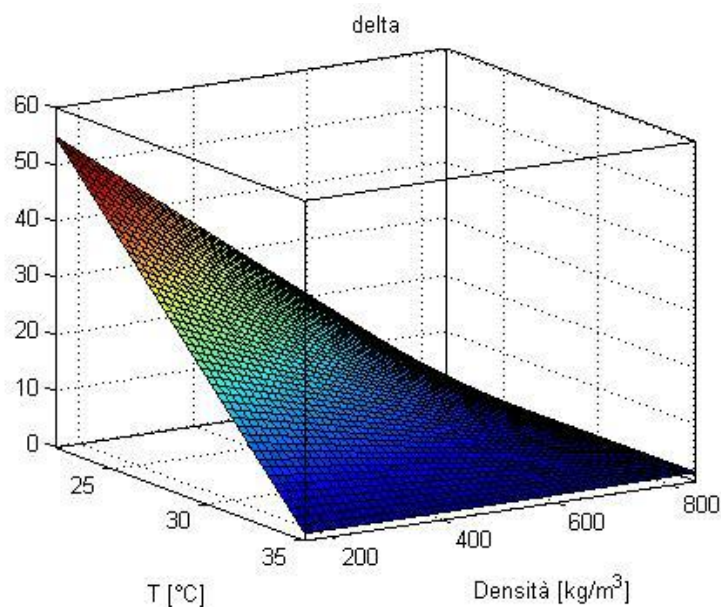


Figura 5.19. Andamento del parametro δ in funzione di temperatura e densità per il trattamento con CO_2 di *E. coli*

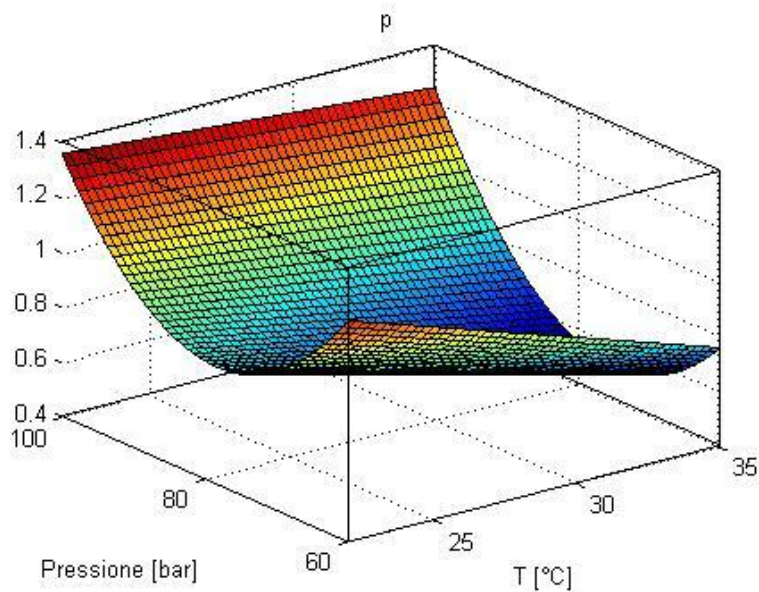


Figura 5.20. Andamento del parametro p in funzione di temperatura e pressione per il trattamento con CO_2 di *E. coli*

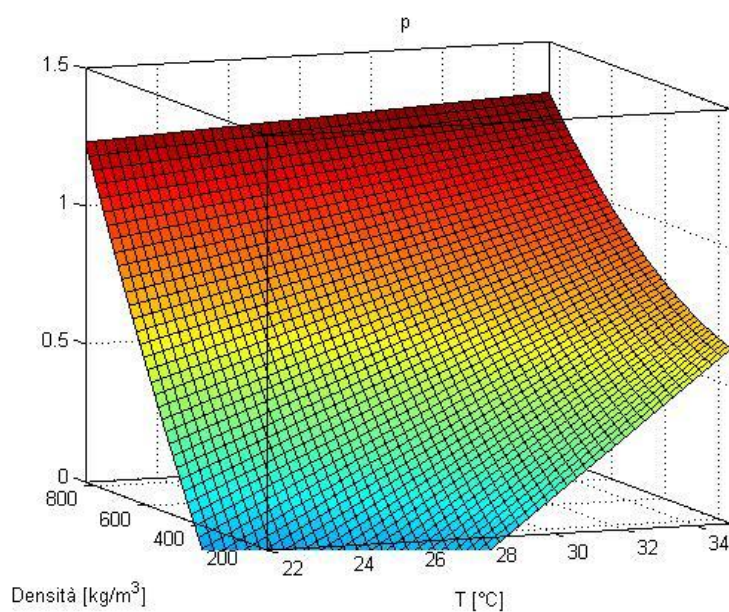


Figura 5.21. Andamento del parametro p in funzione di temperatura e densità per il trattamento con CO_2 di *E. coli*

In Tabella 5.7 sono riportati i valori dei parametri del modello per le cinetiche della flora naturale della carota.

Tabella 5.7. Valori dei parametri δ e p del modello di Weibull modificato per la disattivazione della flora naturale della carota alla pressione di 120 bar

Temperatura (°C)	ρ CO ₂ (Kg/m ³)	Microrganismo	Trattamento	δ	p
22°C	865	Mesofili	CO ₂	0.01	0.16
			CO ₂ + HPU	0.00001	0.10
		Coliformi	CO ₂	0.3	0.63
			CO ₂ + HPU	0.01	0.21
		Lattobacilli	CO ₂	0.25	0.19
			CO ₂ + HPU	1.26	0.32
		Muffe e lieviti	CO ₂	0.01	0.24
			CO ₂ + HPU	0.05	0.25
35°C	767	Mesofili	CO ₂	0.007	0.15
			CO ₂ + HPU	0.01	0.22
		Lattobacilli	CO ₂	0.3	0.16
			CO ₂ + HPU	0.00001	0.07

Nelle figure successive sono riportate le cinetiche di abbattimento della flora naturale a 22°C e 120 bar confrontate con le curve ottenute col modello di Weibull: per la flora mesofila in Figura 5.22, i coliformi totali in Figura 5.23, i batteri lattici in Figura 5.24 e muffe e lieviti in Figura 5.25.

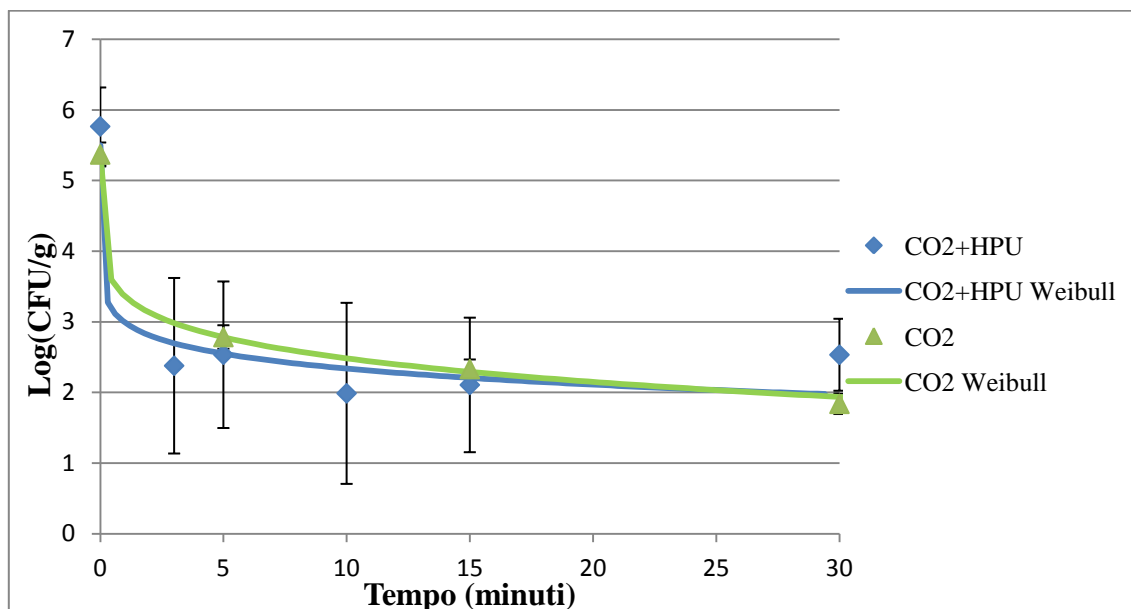


Figura 5.22. Cinetica di abbattimento della flora mesofila a 22°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

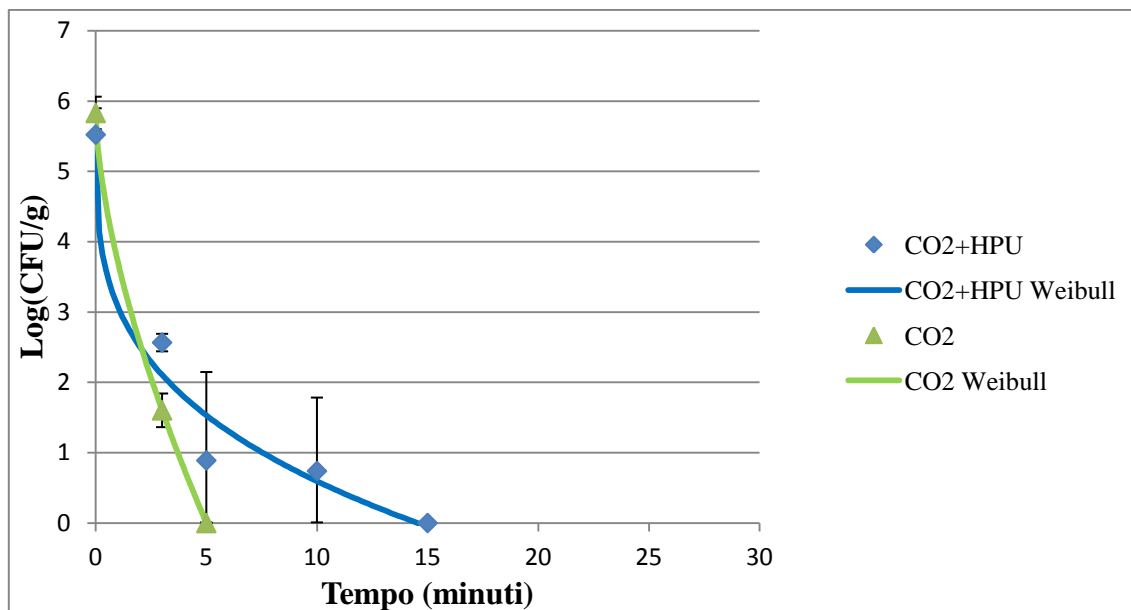


Figura 5.23. Cinetica di abbattimento dei coliformi totali a 22°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

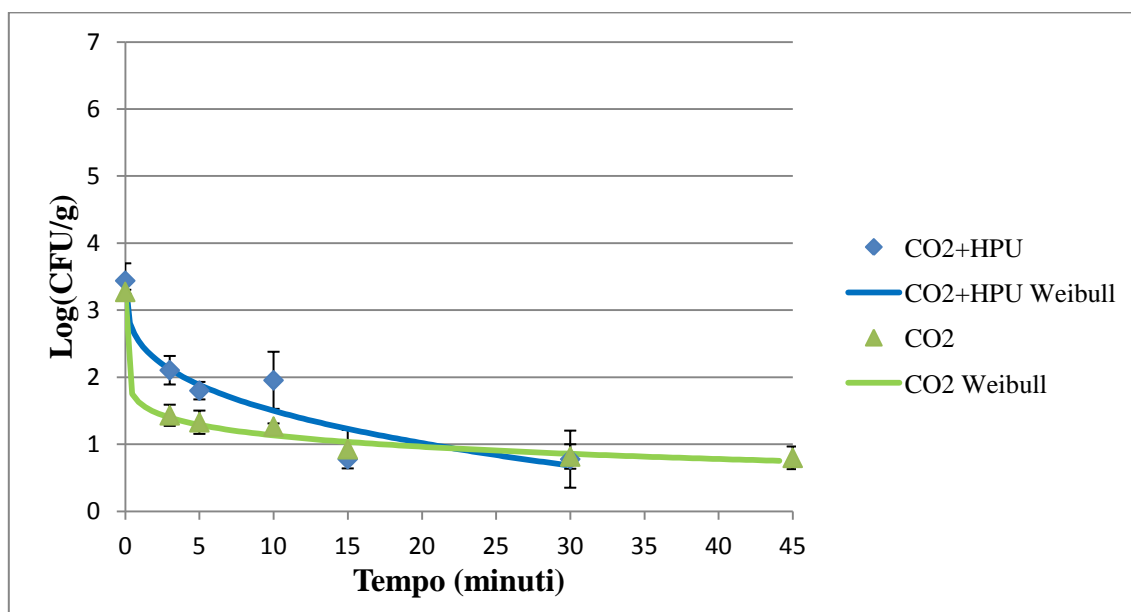


Figura 5.24. Cinetica di abbattimento dei lattobacilli a 22°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

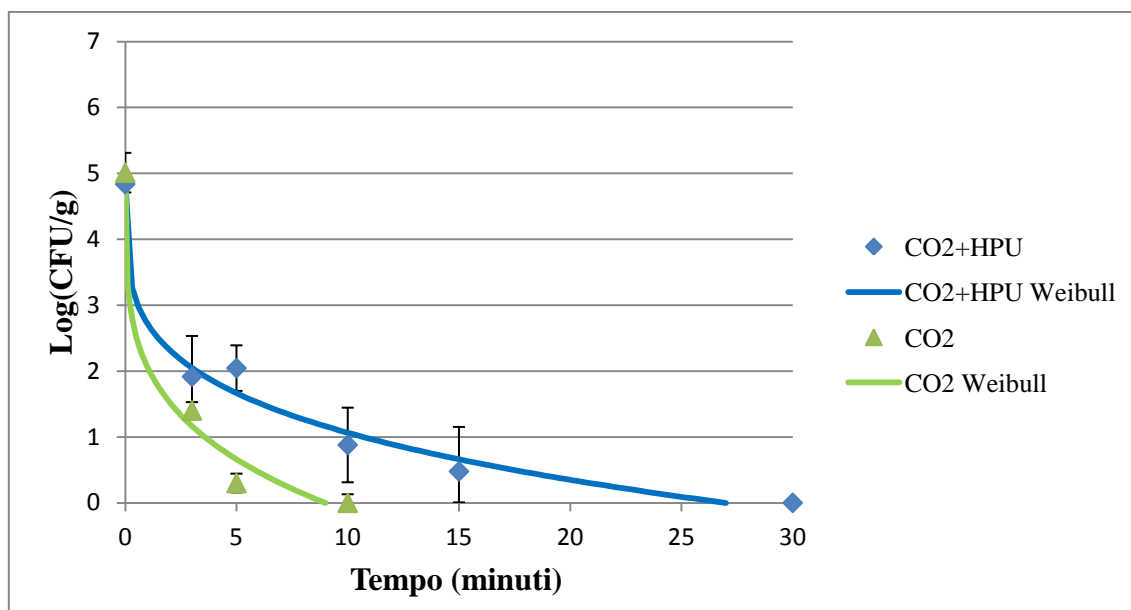


Figura 5.25. Cinetica di abbattimento di muffe e lieviti a 22°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

Come si vede dai grafici riportati nelle Figura 5.22, 5.23, 5.24, 5.25 il modello risulta molto accurato nella determinazione della cinetica di abbattimento della flora naturale, sia per il trattamento con CO₂ sia per il trattamento combinato.

Nel caso delle cinetiche riportate in Figura 5.26 e 5.27, relative alle cinetiche di disattivazione della flora mesofila e dei batteri lattici della carota, la correlazione non è del tutto soddisfacente per il trattamento combinato con CO₂ e ultrasuoni, ciò è da imputare alla differenza di concentrazione della flora naturale presente su ciascun campione, che quindi rende difficile determinare un profilo di abbattimento perfettamente riproducibile ed univoco, e non ad una scarsa accuratezza del modello.

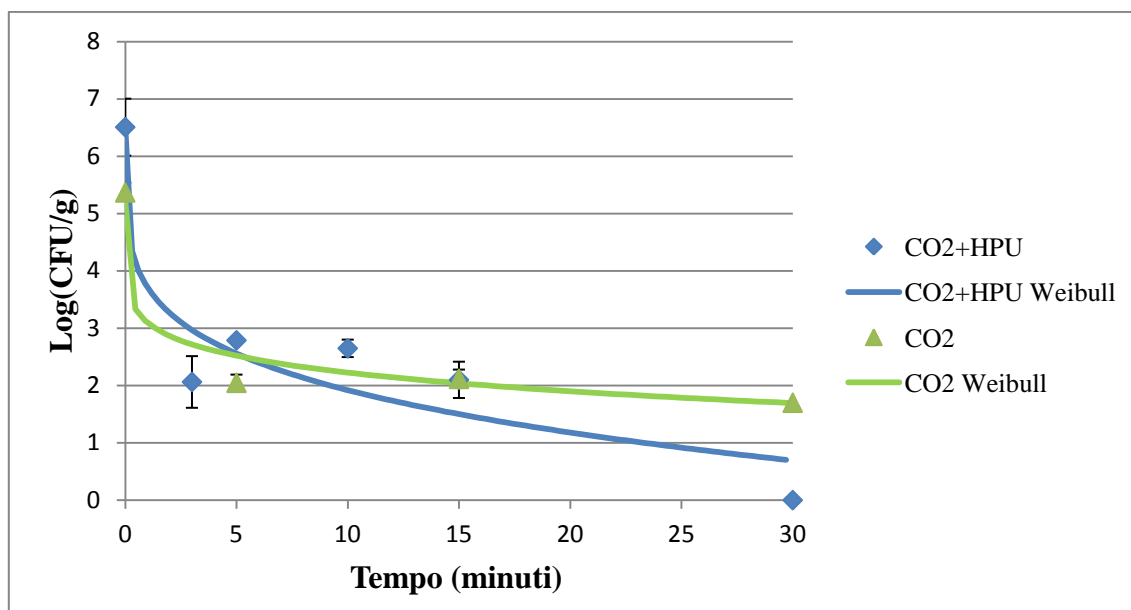


Figura 5.26. Cinetica di abbattimento della flora mesofila a 35°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

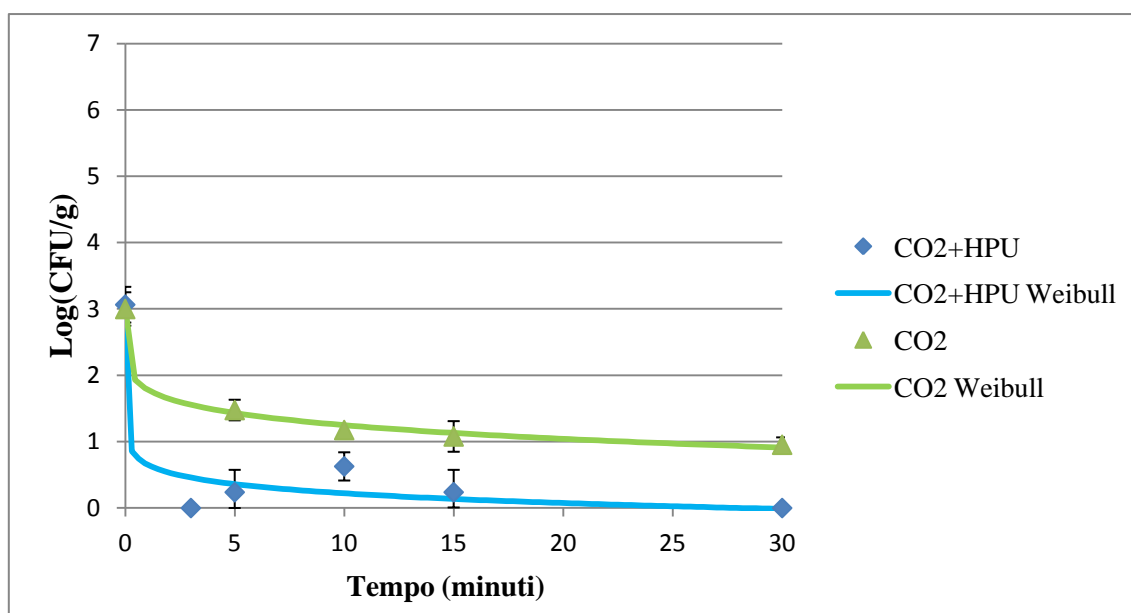


Figura 5.27. Cinetica di abbattimento dei lattobacilli a 35°C e 120 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

Le cinetiche di coliformi e muffe e lieviti non sono riportate in quanto si ha la disattivazione completa per il trattamento combinato in 3 minuti e non è quindi possibile applicare il modello.

Osservando i grafici di abbattimento ed i valori dei parametri del modello riportati in Tabella 5.9 è evidente che la flora naturale risulta più sensibile al trattamento di pastorizzazione:

infatti, il tempo necessario per ottenere la prima riduzione decimale (δ) è molto basso (dell'ordine di pochi secondi). Dai valori del secondo parametro (p) si osserva però come una volta morta la frazione più sensibile in tempi rapidi, sia ancora presente sul campione una popolazione microbica molto resistente al trattamento.

Le frazioni microbiche più resistenti al trattamento di pastorizzazione con CO₂ a 22°C e 35°C sono rappresentate dalla flora mesofila e dai lattobacilli, i quali non vengono ridotti totalmente neanche con un trattamento di 30 minuti. In questo caso il trattamento combinato si comporta in modo simile al trattamento con CO₂.

Per la flora mesofila e i coliformi a 22°C e per i lattobacilli a 35°C si osserva una diminuzione dei tempi necessari per ottenere la prima riduzione decimale. Nonostante questo, però, il trattamento combinato a 22°C risulta in media meno efficace del trattamento solo con CO₂.

Dalla correlazione delle cinetiche di abbattimento di *E. coli* in liquido a 35°C e 100 bar, Tabella 5.8 e Figura 5.28, si conclude che il trattamento con ultrasuoni ha una cinetica di disattivazione simile al primo ordine. Il modello di Weibull modificato non riesce però a seguire in modo corretto la cinetica di disattivazione del trattamento combinato con ultrasuoni e CO₂ in pressione; con i parametri indicati riportati in tabella si ottiene che in un tempo di 7 minuti è ancora presente una concentrazione microbica di circa 3.5 log quando in realtà la disattivazione del campione è già completa. Ciò è dovuto a una fase stazionaria iniziale abbastanza lunga nella cinetica di disattivazione, seguita da una rapida morte della carica batterica.

Tabella 5.8. Valori dei parametri δ e p del modello di Weibull modificato per la disattivazione di *E. coli* in una soluzione tampone peptone fosfato sterile

Temperatura (°C)	Pressione (bar)	Trattamento	ρ CO ₂ (Kg/m ³)	δ	p
35	100	HPU	712	1.98	0.77
		CO ₂		0.00082	0.09
		CO ₂ +HPU		0.15	0.4

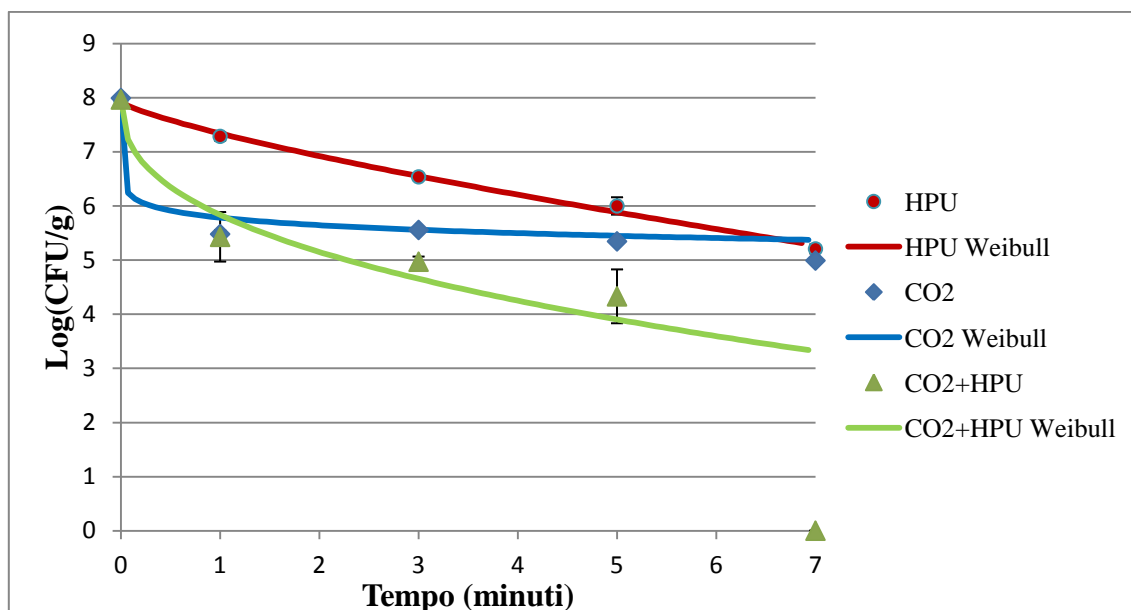


Figura 5.28. Cinetica di disattivazione di *E. coli* a 35°C e 100 bar, confronto tra dati sperimentali e modello

5.3 Considerazioni conclusive

I risultati ottenuti in questa tesi contribuiscono alla ricerca di nuove tecnologie per la pastorizzazione di matrici alimentari a bassa temperatura. È stato dimostrato come l'accoppiamento degli ultrasuoni con CO₂ in pressione abbia un effetto sinergico nell'inattivazione microbica di substrati solidi, rispetto ai due trattamenti singoli. D'altra parte l'effettiva applicazione di questa tecnologia su larga scala richiede che vengano approfonditi alcuni importanti aspetti relativi al meccanismo di inattivazione del trattamento combinato, ed all'effetto del trattamento sulle caratteristiche sensoriali, nutrizionali, chimico fisiche del campione trattato.

Conclusioni

In questa tesi è stato studiato l'effetto degli ultrasuoni accoppiati al processo di pastorizzazione con CO₂ in pressione, per il trattamento di matrici alimentari solide.

Gli alimenti considerati sono stati cocco e carota, sui quali sono stati valutati gli effetti del trattamento di CO₂ in pressione e del trattamento combinato di ultrasuoni e CO₂ in pressione sia per quanto riguarda la flora microbica naturalmente presente sia i microrganismi appositamente inoculati.

Gli esperimenti sono stati condotti a diverse condizioni di pressione, temperatura e tempo di trattamento con CO₂. Successivamente, nelle stesse condizioni sono state effettuate prove applicando simultaneamente gli ultrasuoni, in modo da quantificare l'effetto sinergico dato dall'accoppiamento dei due trattamenti sulla velocità di disattivazione.

Dai risultati ottenuti si è concluso che il trattamento combinato a 40°C e 50°C a pressione di 120 bar applicato per un tempo di 10 e 20 minuti, rispettivamente, risulta efficace nell'abbattimento di *S. enterica* inoculata su cocco, mentre il solo trattamento con CO₂ supercritica, applicato per tempi maggiori, non riesce a ridurre in modo soddisfacente la carica microbica.

Per quanto riguarda la flora naturale sul cocco, si è dimostrato che i batteri lattici, i coliformi e muffe e lieviti, vengono totalmente inattivati dal trattamento combinato in un tempo di 30 minuti a 35°C e 120 bar.

Le prove con inoculo di *E. coli* su carota hanno evidenziato la notevole sensibilità del microrganismo al trattamento in pressione: la disattivazione totale della carica microbica inoculata sul campione è raggiunta in 30 minuti a 60 e 80 bar e in 15 minuti a 100 bar e temperatura di 22°C. Accoppiando al trattamento con CO₂ quello a ultrasuoni i tempi vengono ridotti a 7 minuti a tutte le pressioni di trattamento testate. L'incremento di temperatura a 35°C permette di ridurre, a pressione di 100 bar, a 3 minuti il tempo necessario per avere la disattivazione completa della carica microbica, e a 5 minuti per il trattamento a 80 bar. Alla pressione di 60 bar non si registra invece una diminuzione dei tempi necessari per ottenere la disattivazione completa della carica microbica.

Le prove condotte sulla flora naturale della carota a 22°C e 120 bar mostrano che il trattamento combinato ha un'efficacia paragonabile (nel caso di muffe e lieviti addirittura inferiore) al solo trattamento con CO₂ in pressione.

Aumentando la temperatura a 35°C l'effetto degli ultrasuoni diviene evidente garantendo l'abbattimento della flora mesofila e dei batteri lattici in un tempo di 30 minuti; coliformi e muffe e lieviti sono totalmente disattivati dopo 5 minuti di trattamento.

Le cinetiche di abbattimento ottenute sono state correlate utilizzando il modello di Weibull modificato, che si è dimostrato in grado di riprodurre in modo accurato la maggior parte dei dati sperimentali.

Riferimenti bibliografici

- Boysen L., and H. Rosenquist. 2009 Reduction of thermotolerant *Campylobacter* species on broiler carcasses following physical decontamination at slaughter. *J Food Prot.* 72:497-502.
- Balaban O., Ferrentino G., Dense Phase Carbon Dioxide: Food and Pharmaceutical Applications, Wiley-Blackwell 2012
- Cabeza MC, ordonez JA, Cambero I, de la Hoz L, Garcia ML. 2004 Effect of thermoultrasonication on *Salmonella enterica* Serovar Enteridis in distilled water and intact shell eggs. *J Food Prot* 60:1886-91.
- Chemat F., Zill-e-Huma, Kamran Khan M., Application of ultrasuound in food Thecnology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 15 (2011) 813-835
- Dillow, A.K., Dehgani, F.,Hrkach, J.S., Foster, N.R., Langer, R., Bacterial inactivation by using near and supercritical carbon dioxide, Poceeding of the National Academy of Science 96, 100344-10348, 1999
- Ferrentino G., Balzan S., Dorigato A., Pegoretti A., Spilimbergo S. 2012. Effect of Supercritical carbon Dioxide Pasteurization on Natural Microbiota, Texture and Microstructure of Fresh-Cut-Coconut. *J Food S* 77:E137-43
- Ferrentino G., Balzan S., Spilimbergo S. 2012. Supercritical carbon Dioxide of Dry Cured Ham Spiked with *Listeria monocytogenes*: Inactivation Kinetics, Color and Sensory Evaluations. *Food Bioprocess Technol.*
- Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Spilimbergo S, Elst K, Van Ginneken L, Debevere J, Van Impe JF, Devlieghere F. 2007. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and future. *Int J Food Microbiol* 117:1–28.
- Geeraerd A.H., Valdramidis V.P., Van Impe J.F. (2005) GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal Food Microbiology*, 102, 95-105.
- Hong S., Park W.S., Pyun Y.R., Inactivation of *Lactobacillus* sp, from Kimcki by High pressure Carbon Dioxide, *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* Volume 30, 681-685, 1997
- Isenschmid, A., Marison, I.W., Von Stockar, U., 1995. The influence of pressure and temperature of compressed CO₂ on the survival of yeast cells. *Journal of Biotechnology* 39, 229–237.
- Lee, B.H., Kermasha, S., Baker, B.E., 1989. Thermal, ultrasonic and ultraviolet inactivation of *Salmonella* in thin films of aqueous media and chocolate. *Food Microbiology* 6, 143–152.

- Manas, P., Pagan, R., Raso, J., Sala, F. J., & Condon, S. (2000). Inactivation of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Senftenberg by ultrasonic waves under pressure. *Journal of Food Protection*, 63(4), 451–456.
- M.T.Valverde, F. Marin-Iniesta, L. Calvo 2010. Inactivation of *Saccaromyces cerevisiae* in conference pear with high pressure carbon dioxide an effects on pear quality. *J Food E* 98, 421-428.
- Mafart P., O. Couvert, S. Gaillard and I. Leguerinel 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107-113
- Ortuno C., Martinez-Pastor M.T., Mulet A., Benedito J., 2012. An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.
- Pagan, R., Manas, P., Raso, J., & Condon, S. (1999). Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure at nonlethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Applied Environmental Microbiology*, 65(1), 297–300.
- Parton, T., Elvassore, N., Bertucco, A., Bertoloni, G., 2007. High pressure CO₂ inactivation of food: a multi-batch reactor system for inactivation kinetic determination. *Journal of Supercritical Fluids* 40, 490–496.
- P. Piyasena, E. Mohareb, R.C. McKellar 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology* 87: 207-216.
- Rikke K. Morild, Pia Christiansen, AndresH. Sorensen, Ulf Noboe, and Soren Aabo, 2010. Inactivation of Pathogens on pork by Steam-Ultrasound Treatment. *J of Food Prot.* 74:769-775
- Riera, E., Golas, Y., Blanco, A., Gallego, J.A., Blasco, M., Mulet, A., 2004. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* 11, 241–244.
- Sims M, Estigarribia E. 2003. Membrane carbon dioxide sterilization of liquid foods: scale up of a commercial continuous process. *Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids*, April 28–30, Versailles, France.
- Spilimbergo S., Elvassore N., Bertucco A., Microbial inactivation by high pressure, *journal of Supercritical Fluids*, volume 22. 325-329, 2002
- Yun C., Kedie, C., Shulai C., Adshiri T., Arai K., Effects of ultrasound on mass transfer in superctitcal extraction, 4th International Symposium on Supercritical Fluids, 11-14 May, Sendai, Japan, 1997, 707-710